Zur Kenntnis der Aktivierung der Hefe.

Von **Hans Euler** und **Jakob Sahlén.**

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

Während Giftwirkungen an Mikroorganismen in zahlreichen experimentellen und theoretischen Arbeiten behandelt worden sind, liegen über Aktivierungen noch relativ wenige quantitative Angaben vor, unter welchen besonders diejenigen von Hüne, A. Koch und Broun Fred zu nennen sind.

Die für das Verständnis der aktivierenden Wirkungen notwendige Unterscheidung zwischen der Beförderung des Wachstums einerseits und der Erhöhung der Gärwirkungen der Zellen — also einer Beschleunigung der Enzymwirkung — andererseits ist erst in neueren Arbeiten gemacht worden. Was zunächst die Wachstumsbeförderung betrifft, so sind außer den bekannten Untersuchungen von Effront über die Einwirkung des Fluors auf Hefe folgende Angaben zu erwähnen:

Die ersten Beobachtungen verdankt man Raulin[1]), welcher zeigte, daß man die Entwickelung von Schimmelpilzen in hohem Grade durch Zusätze von Zink- und anderen Metallsalzen zur Nährlösung steigern kann.

Nägeli (1893) hat die von ihm beobachteten wachstumsfördernden Einflüsse minimaler Giftmengen als „oligodynamische Wirkungen“ bezeichnet.

Später hat dann Kosinski[2]) den günstigen Einfluß der Zinksalze auf die Atmungstätigkeit von Aspergillus und Javillier[3]) auf den Myzelzuwachs festgestellt.

Auch Kupfersalze können, wie schon lange bekannt, das Wachstum von Mikroorganismen befördern. Ein ähnliches Resultat erzielte bezgl.

---

[1]) Raulin, Ann. des sciences Bot., Bd. 5, 1869, Heft 11, S. 93.

[2]) Kosinski, Jahrb. wiss. Bot., Bd. 37, 1901.

[3]) Javillier, Ann. de l'Institut Pasteur. 1908.

Aspergillus niger Ono[1]), welcher bei einem Zusatz von 0,004 % eine Verdoppelung des Erntegewichts beobachtete; 0,064 % fand er bereits schädlich. In Übereinstimmung hiermit steht der Nachweis von Kanter[2]), daß eine Konzentration von 0,005 % begünstigt. Nach Hattori[3]) liegt die günstigste Konzentration für Aspergillus bei 0,004 %, für Penicillium bei 0,008 %.

Für Hefe fand Pozzi-Escot[4]) einen Kupfersulfatzusatz von 0,01 % bis 0,002 % günstig. Eine Vermehrung der Gärungstätigkeit der Hefe fand Krüger[5]) bei einer Sulfatkonzentration von 0,003 %.

Sehr sorgfältige Messungen über die Wachstumsbeschleunigung von Bakterien durch Giftreize verdankt man Hüne (Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 48, 1909, S. 135) und E. Broun Fred.

Nach E. Broun Fred[6]) wird das Wachstum der Bierhefe durch 0,001 % Kupfervitriol begünstigt[7]).

Auch für Eisen- und Mangansalze wurde ein günstiger Einfluß auf die Hefeentwicklung konstatiert und zwar bei einer Konzentration von ungefähr 0,01 % Eisen. Mangan wurde bereits von Raulin als Reizstoff verwendet und zwar bei Aspergillus niger mit positivem Erfolg.

Zeit	ccm CO_2			
Stunden	$HgCl_2$ = 0	Diff.	$HgCl_2$ = 0,0002 %	Diff.
8,45	9,50		13,00	
		0,30		0,40
9,00	9,80		13,40	
		0,20		0,50
9,15	10,00		13,90	
		0,20		0,10
9,30	10,20		14,00	
		0,50		0,60
9,45	10,70		14,60	
		0,30		0,40
10,00	11,00		15,00	
		0,45		0,55
10,15	11,45		15,55	
		0,50		0,55
10,30	11,95		16,10	
1,00	17,30		21,90	
		0,45		0,70
1,15	17,75		22,60	

[1]) Ono, Journ. of science. Tokyo 1900.

[2]) Kanter, Dissertation. St. Petersburg 1913.

[3]) Hattori, Bot. Inst. Univers. Tokyo 1900.

[4]) Pozzi-Escot,

[5]) Krüger, Centralbl. f. Bakt., Bd. 1.

[6]) E. Broun Fred, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 31, 1911, S. 185.

[7]) In einer nach Abschluß der vorliegenden Mitteilung erschienenen umfassenden Arbeit von Th. Bokorny (Biochem. Zeitschr., Bd. 50, 1913, S. 1) wird aber Bierhefe durch 0,001 % Kupfervitriol bereits getötet.

Giftiger als Kupfersalze ist für die Hefe Sublimat, wenngleich es nach den Beobachtungen von Weinke (a. a. O.) und Wehmer[1]) ein verhältnismäßig schwaches Hefengift ist. Nach Schulz (a. a. O.) soll auch bei diesem Stoff eine begünstigende Wirkung der Gärung gegenüber eintreten und zwar bei einer Konzentration von 0,0002 %. Die vorstehenden Zahlen, welche die in den nebenstehenden Zeiten entwickelte Anzahl ccm angeben, zeigen, daß die Angaben dieses Verfassers einer Nachprüfung bedürftig sind.

Unter den best untersuchten Optimalkonzentrationen von Aktivatoren in Nährlösungen von Mikroorganismen sind diejenigen der Wasserstoffionen. Eine gewisse Konzentration dieser Ionen begünstigt sowohl das Wachstum als auch die Gärwirkungen, während eine weitere Vergrößerung dieser Konzentration in beiden Hinsichten hemmend wirkt. Die Optimalkonzentrationen der Wasserstoffionen liegen für verschiedene Mikroorganismen ganz verschieden, worauf mehrere Methoden zur Verbesserung des Hefengutes durch Säuerung beruhen. Angaben über solche Optimalkonzentrationen gegenüber Schimmelpilzen hat Nikitinsky[2]) gebracht. Das Verhalten der Hefen gegenüber Wasserstoffionen wird gegenwärtig von anderer Seite monographisch behandelt und soll deswegen hier nicht berührt werden.

Die Einwirkung der Säuren beruht indessen nicht nur auf der Wirkung der Wasserstoffionen, sondern auch auf der Natur der Anionen bezw. der nicht dissoziierten Moleküle. So üben z. B. Buttersäure, Weinsäure, Oxalsäure u. a. spezifische Einflüsse aus. Ameisensäure soll nach Duclaux[3]) in einer Konzentration von 0,04 % die Entwicklung der Bierhefe hemmen, während nach Beijerinck[4]) Milchsäure in bestimmten Konzentrationen die Hefebildung steigert.

Was speziell Kohlenstoffverbindungen betrifft, welche in kleineren Konzentrationen eine fördernde, in größeren Konzentrationen auf Mikroorganismen eine hemmende Wirkung ausüben, so liegen quantitative Angaben in bezug auf Schwefelkohlenstoff vor. Diese Substanz übt bekanntlich eine wachstumsfördernde Wirkung auf höhere Pflanzen aus, welche nach A. Koch als eine direkte Reizwirkung anzusehen ist.

Der gleiche Stoff soll nach einem von Goerner patentierten Verfahren die Vermehrung der Hefe begünstigen.

---

[1]) Wehmer, Chem. Zeitung, Bd. 21, 1897, S. 73; Bd. 23, 1899, S. 163.

[2]) Nikitinsky, Jahrb. wiss. Bot., Bd. 40, 1904, S. 1.

[3]) Duclaux, Ann. de l'Inst. Pasteur, Bd. 6, 1892, S. 593.

[4]) Beijerinck, Arch. Néerl., Bd. 23, 1890.

Koch konnte eine Anregung der Gärtätigkeit durch CS_2 nicht erzielen, dagegen wurde nach seinen Versuchen die Hefe durch Äther deutlich aktiviert (Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 31, 1911).

Nach Fred steigert Schwefelkohlenstoff in der Konzentration von 0,001 % die Vermehrung des Bacillus pyocyaneus.

Benzol, Toluol und Xylol wirken nach Wernke[1]) schon in Konzentrationen von 0,5, 0,3 und 0,12 % tötend auf die Hefe.

Phenol ist hinsichtlich seiner Wirkung auf Hefe mehrfach untersucht worden. An die ältesten Arbeiten von Buchholz, Hoffmann[2]) und Fleck[3]) schließt sich eine Untersuchung von Knoesel[4]) an, nach welcher eine Konzentration von 5 % für Hefezellen bereits tödlich ist. Eine Optimalkonzentration ist indessen nicht festgestellt worden.

Salizylsäure übt nach Will[5]) auf Hefe eine bedeutende Desinfektionswirkung aus. Aus den Versuchen von Schulz, welche unter anderen Substanzen auch Salizylsäure behandeln, läßt sich nur schwer ein Schluß auf die Art der Einwirkung der Salizylsäure auf Hefe ziehen. Bei seinen Versuchen wurde während 3 Stunden die Entwickelung von 2—5 ccm Kohlensäure beobachtet. Länger wurde die Gärung nicht verfolgt, und auch in dieser Periode zeigen die Kurven große Unregelmäßigkeiten.

Wehmer[6]) hat gezeigt, daß Benzoesäure und Salizylsäure in einer Konzentration von 0,1 % die Entwicklung der Hefe vollständig hemmen, während die entsprechenden Mengen von Meta- und Paraoxybenzoesäure die Hefe nicht wesentlich beeinflussen. Heinzelmann[7]) hat andererseits gefunden, daß Salizylsäure in einer Konzentration von 0,01 % die Hefeentwicklung begünstigt.

Nach einer Untersuchung von Biernacki wird durch den Eintritt einer zweiten Hydroxylgruppe in das Phenol die Giftigkeit dieses Stoffes nicht erhöht, sondern vielmehr vermindert.

---

[1]) Wernke, Dissertation, Dorpat 1879. Auf die Gärungshinderung durch Benzol hat schon früher Lintner aufmerksam gemacht. (N. Rep. Pharm., Bd. 19, 1870, S. 207.)

[2]) Hoffmann, Mykol. Ber., Bd. 1, 1870, S. 30.

[3]) Fleck, Vergleichende Versuche zur Feststellung des Wertes der Salizylsäure als Desinfektionsmittel, insbesondere als Pilz- und Hefengift. München, Oldenbourg, 1875, S. 53. Zitiert nach Will, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, Bd. 16, 1893, S. 151.

[4]) Knoesel, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 8, 1902, S. 241.

[5]) Will, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, Bd. 17, 1894, S. 61.

[6]) Wehmer, Chem. Ztg., Bd. 21, 1897, S. 73.

[7]) Heinzelmann, Zeitschr. f. Spiritusindustrie, Bd. 5, 1882, S. 458.

Die Resultate von Biernacki wurden von K. Yabe[1]) bestätigt und durch Messungen für Brenzkatechin, Hydrochinon und Phloroglucin erweitert.

Die vorstehenden Daten können eine Vorstellung von dem Stand unserer Kenntnisse auf diesem Gebiete geben, wenn sie auch auf Vollständigkeit keinen Anspruch machen.

Wir gehen nun zur Mitteilung unserer eigenen Ergebnisse über.

Versuchsbedingungen.

Die Gärungsgeschwindigkeit wurde in allen Fällen durch Messung der zu gewissen Zeiten entwickelten Kohlensäuremengen festgestellt. Zur Vergärung kamen bei jedem Versuch 2 g Rohrzucker, gelöst in 20 ccm Wasser. Diese Lösung befand sich in kleinen Erlenmeyerkolben von 50 ccm Inhalt, welche nach Zusatz des Aktivators und von 1 g frischer Hefe mit genau geteilten Gasbüretten durch Kapillarröhren verbunden wurden. Die Erlenmeyerkolben befanden sich in einem Thermostaten, welcher konstant auf einer Temperatur von 30° gehalten wurde.

Tabelle I.

Guajakol g	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	28	68,5	111,5	152	191,5	227	265,5	300
1,0	3,5	3,5	3,6	3,8	3,9	3,9	4	4
0,25	26	55	88	117	144	177	203	228
—	32	74,5	117,5	158	200	237	277	312
0,5	15	30	49	64	84	100	114	129
0,125	30	70,5	115,5	154,5	197,5	232	271,5	302
—	38,5	84	128	174,5	213	253	288	324
0,0625	37	81	128	174,5	215,5	254	290	325
0,0312	41,5	93	138	185	226	269	304	344
—	33	75,5	120	164,5	201,5	238	275	310
0,0156	31	75	121	165	202	241	277	311
0,0078	35	78	124	169	206	247	281	315

[1]) K. Yabe, Chem. Centralbl., Bd. 65 [2], 1894, S. 1048.

Tabelle II.

Resorzin g	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	34	77,5	—	—	209	251	289	326,5
0,5	24	51	—	—	134,5	163	190	217
0,125	35,5	76,5	—	—	206,5	249,5	286	319
—	34,5	75	120	162	201,5	238,5	277	311
0,0625	36	76	118	158	198	233	272	304
0,0312	34	72	117	156,5	198	233	274	307

Tabelle III.

Hydrochinon	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	40	86	130	177	214	253	292	328
0,625	41	91	135	184	220	261	297	333
0,125	43	94	137	182	227	263	297	334

Tabelle IV.

Na-Salicylat g	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	31	69,5	114	152	191	225	—	—
1,1	11	18	23	28	32	37,5	—	—
0,55	16	29	39	50	60	69	—	—
—	35,5	85	132	180	223	264	302	341
0,275	26	52	81	106,5	129	153	177	194
0,137	32	66	105	139	176	206	235	265
—	32,5	75,5	122	164	203	242	279	314
0,0685	32	73	114	153	190	228	264	297
0,034	36	80	127	173	214	258	294	334
—	30	68	110	148	—	—	257	290
0,017	26,5	65	109	151	—	—	264	303
0,008	31	69	112	153	—	—	268	303

Tabelle V.

Na-Azetyl-salizylat g	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	35	77	120	160	201	243	277	210
0,25	—	78	123	164	200	247	280	—
0,50	36	76	122	162	202	246	279	316

Tabelle VI.

Hexa-methylen-tetramin g	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	38	78	124	166	206	244	281	314
0,25	38,5	82	132	177	223	266	304	340
—	33	73	115,5	154	193	226	263	294
0,135	37,5	80	131	178	218	259	300	340

Tabelle VII.

Azetaldehyd	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	37	86	138	187,5	232	276	317	356
0,25	13	24	36	50	64	81	100	116
—	32	67	107	—	179	211	241	272
0,125	23	52	85	—	153	185	218	248
0,05	32	67,5	107	—	180	212	244	276

Tabelle VIII.

Azetanilid	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	34	70,5	114	153	191	229	263	297
Gesättigte Lös.	24,5	47	70	96	118	139,5	159	180

Tabelle IX.

Chininsulfat	ccm CO_2 während							
	30 Min.	60 Min.	90 Min.	120 Min.	150 Min.	180 Min.	210 Min.	240 Min.
—	25,5	54,5	85	121	155	189	222	253
Gesättigte Lös.	15,5	20,5	25	27,5	29	31	33	34

Die Ablesungen in den Gasbüretten wurden jede halbe Stunde vorgenommen, nachdem die betreffenden Kolben bei Unterdruck längere Zeit stark geschüttelt worden waren, um eine Übersättigung der Lösung an Kohlensäure zu vermeiden. Zu jedem Versuch wurde ein Kontrollversuch angestellt.

In den vorstehenden Tabellen sind die abgelesenen Kubikzentimeter Kohlensäure verzeichnet, welche unter den gewählten Bedingungen erhalten wurden, und zwar sind stets die Mittelwerte aus zwei innerhalb 1 % übereinstimmenden Versuchen angegeben. Da jeden Tag frische Hefe angewandt wurde, welche wir nach sorgfältigem Waschen in einer Differentialpresse abpreßten, wurden, um von den täglichen Variationen der Hefe unabhängig zu sein, bei jeder Versuchsserie zwei Versuche mit der Hefe ohne Zusatz angestellt. Die Tabellen sind so zusammengestellt, daß deutlich hervorgeht, welche Ablesungen direkt miteinander vergleichbar sind.

Unter den Resultaten, welche sich aus den Tabellen ergeben, sei Folgendes hervorgehoben:

Für drei Substanzen wurden zum ersten Mal vollständigere Reizkurven festgestellt, welche mit einer Aktivierung beginnen und dann in eine Hemmung übergehen. Für Natriumsalizylat wird das Optimum mit einer Konzentration von 0,05 % erreicht, für Guajakol mit einer Konzentration von 0,035 %. Ebenso gering ist die optimale Konzentration von Azetaldehyd, nämlich etwa 0,05 %.

Diese Konzentrationen, in welchen organische Stoffe eine Erhöhung der Gärwirkung hervorbringen, sind immerhin größer als diejenigen, in welchen anorganische Gifte die Gärung begünstigen sollen. Wie nämlich in der Einleitung angegeben ist, liegen die aktivierenden Konzentrationen des Kupfersulfats bei 0,02 % und die des Sublimats bei etwa 0,002 %.

Die untersuchten organischen Protoplasmagifte werden also in höherem Grade von den Hefezellen unschädlich gemacht als die Metallionen, Cu und Hg resp. die Moleküle $HgCl_2$.

Von der in Fig. 1 dargestellten Form der Reizkurven, welche alle dem Liebig-Arndtschen Gesetz entsprechen, kann man sich folgende Vorstellung bilden:

Das Protoplasmagift Guajakol und dergl. wird von den Zellen bis zu einem gewissen Grade resorbiert. Es übt auf das Protoplasma einen störenden Einfluß aus, und der Organismus der Zelle sucht zunächst das eingedrungene Gift unschädlich zu machen. In welcher Weise dies geschieht, ist noch in keinem Fall endgültig festgestellt. Vermutlich wird es durch einen unter normalen Verhältnissen von der Zelle gebildeten Schutzstoff gebunden oder neutralisiert, oder, in anderen Fällen,

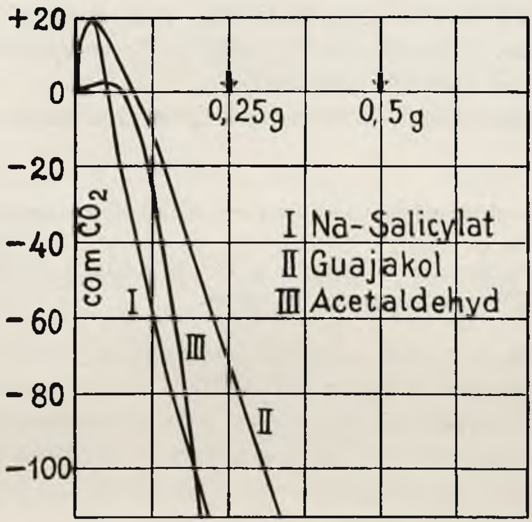


Fig. 1.

durch Verbrennung (Oxydation) unschädlich gemacht. Beim Eindringen von Protoplasmagiften in die Zellen sucht die Zelle zunächst das Gift mit ihren normalen Mitteln zu beseitigen. Tritt mehr Gift in die Zelle ein, als unter normalen Verhältnissen gebunden oder zerstört werden kann, so sucht die Zelle genügende Mengen des neutralisierenden Stoffes oder eines Oxydationskatalysators zu produzieren, und dadurch ihr Plasma unbeschädigt zu erhalten. Mit dieser gesteigerten Produktion von Schutzstoffen oder Oxydationsmitteln ist bis zu einem gewissen Punkt eine allgemeine Steigerung der Lebensprozesse verknüpft. Dringen hingegen noch weitere Giftmengen in die Zelle ein, so kann auch bei erhöhter Lebenstätigkeit das Protoplasmagift nicht

mehr neutralisiert, komplex gebunden oder verbrannt werden und eine Schädigung der Zelle muß die Folge sein.

Demgemäß sind Optimalkonzentrationen wie die oben angegebenen von der absoluten Menge der anwesenden Hefe abhängig und diese muß bei solchen Versuchen stets angegeben werden[1]). Die Hefemenge betrug, wie bereits erwähnt, bei jedem unserer Versuche 1 g.

Unter den übrigen in den obigen Tabellen behandelten Stoffen befindet sich ein Aktivator, welcher erst bei viel größeren Konzentrationen seine Giftwirkung äußert, nämlich Hexamethylentetramin[2]). Dasselbe beschleunigt noch in einer Konzentration von 0,25 % die Hefegärung.

Resorzin und Hydrochinon über eine sehr geringe Wirkung auf lebende Zellen aus. Dieselbe ist für beide Stoffe entsprechend früheren Angaben von Yabe ziemlich gleichartig.

Sehr ausgesprochene Giftwirkung zeigten Azetanilid und Chininsulfat.

---

[1]) Daß die Vergiftungsgrenze von der angewandten Hefemenge abhängt, hat bereits Will festgestellt.

[2]) Hexamethylentetramin ist neuerdings von A. Pollack (D. R. P. 254592) als Zusatz zu gärenden Flüssigkeiten empfohlen worden.

Über die primäre Umwandlung der Hexosen bei der alkoholischen Gärung.

II. Mitteilung.

Von **Hans Euler** und **Einar Hille.**

(Aus dem biochemischen Laboratorium der Universität Stockholm.)

In zwei vorhergehenden Mitteilungen[1]) wurden die Werte ermittelt, welche sich ergeben, wenn man Glukose durch lebende Hefe vergären läßt und die Menge des verschwundenen Zuckers einerseits aus der prozentischen Abnahme der optischen Drehung, andererseits aus der gleichzeitig entwickelten Kohlensäure berechnet.

Wir nehmen an, daß diese Differenz durch die primäre Umwandlung des Zuckers in ein anderes Kohlehydrat veranlaßt wird. Teilen wir also die Gärung in zwei Reaktionen (wodurch sich die folgende Darstellung vereinfacht), so können wir die Bezeichnungen einführen:

Reaktion I: Glukose = Umwandlungsprodukt,

„ II: Umwandlungsprodukt = $CO_2 + C_2H_5OH$.

Die Differenz Δ—C beruht demnach darauf, daß das Umwandlungsprodukt schneller gebildet als verbraucht wird. Würde es gelingen, die Reaktion I allein vor sich gehen zu lassen, bezw. die Reaktion II zu unterdrücken, so würde man damit eine Überführung des Zuckers in das Umwandlungsprodukt erreichen und damit dessen Isolierung ermöglichen.

Wie Euler und Berggren gefunden haben, wird nun die Differenz Δ—C durch Zusatz von — selbst nicht gärendem — Hefeextrakt um etwa 20 % vergrößert. Wir haben durch die folgenden Versuche ermitteln wollen, in welcher Weise das Verhältnis der Reaktionen I

---

[1]) Euler und D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 76, 1912, S. 347; Euler und Berggren, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. I, 1912, S. 203.

und II durch den Einfluß von Protoplasmagiften und durch Erwärmen verändert wird.

Versuchsanordnung. Die zu diesen Versuchen angewandte Hefe wurde uns von der hiesigen St. Eriksbrauerei überlassen; sie sei mit HD bezeichnet. Sie wurde im hiesigen Laboratorium gewaschen und abgepreßt. Als vergärender Zucker kam bei allen Versuchen Glukose puriss. von Merck zur Anwendung. Die Temperatur wurde im Ostwaldschen Thermostaten stets auf 30° gehalten.

Im Gegensatz zu der bei der vorhergehenden Untersuchung in Anwendung gekommenen Methodik wurde die entwickelte Kohlensäure stets volumetrisch bestimmt. Die abgelesenen Gasvolumina sind auf 0° und 760 mm Druck reduziert.

Die Drehung der angewandten reinen Glukoselösung wurde in jeder Versuchsreihe gemessen, und der dabei erhaltene Wert wurde zur Berechnung der prozentischen Drehungsänderung benutzt. Zur Ermittelung der prozentischen Kohlensäureentwicklung wurde der theoretische Wert in Rechnung gesetzt, wonach aus 180 g Glukose 88 g Kohlensäure entstehen.

Die Ergebnisse unserer Versuche sind in folgenden Tabellen zusammengestellt, welche in derselben Weise angeordnet sind, wie in der Arbeit von Euler und Berggren[1]). Die Tabellen 1 bis 3 betreffen die Einwirkung von Phenol und von Sublimat. In den drei Versuchsreihen ergab sich das gleiche Resultat. Die Differenz Δ—C verschwindet durch Zusatz des Antiseptikums zur gärenden Lösung fast vollkommen, d. h. das Zwischenprodukt wird ebenso schnell verbraucht als gebildet oder — im Vergleich zu dem Vorgang in reiner Zuckerlösung — wird die Geschwindigkeit der Reaktion I relativ stärker erniedrigt als diejenige der Reaktion II.

Tabelle 1.

50 ccm 20 proz. Glukoselösung 1 g abgepreßte Hefe		Zeit in Min.	Entwickelte CO_2		Drehungsänderung Δ		Diff. Δ—C
			ccm	%	in Graden	%	
Ohne Zusatz	1.	420	472	18,66	10,68 — 7,76 = 2,92	27,30	8,64
	2.	450	432	16,79	10,85 — 8,65 = 2,20	20,27	3,48
2 ccm gesättigte Phenollösung	1.	420	148	5,85	10,27 — 9,64 = 0,63	6,13	0,28
	2.	450	157	6,11	10,43 — 9,76 = 0,67	6,44	0,33

[1]) Euler und Berggren, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. I, 1912, S. 203.

Tabelle 2.

20 ccm 10 proz. Glukoselösung 1 g abgepreßte Hefe	Zeit in Min.	Entwickelte CO_2 ccm	Entwickelte CO_2 %	Drehungsänderung Δ in Graden	Drehungsänderung Δ %	Diff. Δ—C
1 ccm Wasser	60	75	15,86	4,92 — 3,78 = 1,17	23,11	7,31
	120	175	36,88	4,92 — 2,66 = 2,26	45,95	9,05
1 ccm 0,005 norm. Sublimatlösung	90	83	17,09	4,92 — 4,07 = 0,85	17,28	0,19
	200	180	37,87	4,92 — 3,08 = 1,84	37,40	— 0,47

Tabelle 3.

20 ccm 10 proz. Glukoselösung 1 g abgepreßte Hefe	Zeit in Min.	Entwickelte CO_2 ccm	Entwickelte CO_2 %	Drehungsänderung Δ in Graden	Drehungsänderung Δ %	Diff. Δ—C
5 ccm Wasser	75	85	17,84	4,14 — 3,04 = 1,10	26,57	8,73
	135	176	37,20	4,14 — 2,30 = 1,84	44,44	7,24
5 ccm 0,005 norm. Sublimatlösung	75	20	4,16	4,14 — 3,90 = 0,24	5,80	1,64
	135	32	6,16	4,14 — 3,78 = 0,36	8,70	1,96

Durch Zusatz derartiger Gifte ist es also bis jetzt nicht gelungen, die Reaktion II aufzuheben und dadurch die Reaktion I einzeln zur Wirkung gelangen zu lassen.

Tabelle 4a.

20 ccm 10 prozentige Glukoselösung.
10 ccm Wasser
1 g abgepreßte Hefe } 2 Stunden auf 47° erhitzt.

Zeit in Minuten		Entwickelte CO_2 ccm	Entwickelte CO_2 %	Drehungsänderung Δ in Graden	Drehungsänderung Δ %	Diff. Δ—C
1.	390	63	12,92	3,54 — 2,84 = 0,70	19,77	6,85
	450	78	15,89	3,54 — 2,66 = 0,88	24,86	8,77
2.	435	56	11,29	3,54 — 2,84 = 0,70	19,77	8,48
	465	56	11,29	3,54 — 2,82 = 0,72	20,35	9,06

Das gleiche Ziel, die Reaktion II allein zum Stillstand zu bringen und dadurch die Reaktion I gesondert vorsichgehen zu lassen, suchten wir hierauf dadurch zu erreichen, daß die vergärende Hefe durch zweistündiges Erwärmen auf + 47° partiell geschwächt wurde. Es bestand die Möglichkeit, daß die Enzyme der Reaktion II dabei mehr geschädigt würden als die Enzyme der Reaktion I. Aus den Tabellen 4a und 4b

ist zu ersehen, daß dies nicht der Fall ist. Durch das Erwärmen wird zwar die Gärtätigkeit der Hefe auf etwa $^1/_5$ bis $^1/_{10}$ des ursprünglichen Wertes reduziert, aber die Differenz bleibt etwa die gleiche, d. h. die beiden Reaktionen werden entweder in demselben Maße erniedrigt oder aber Reaktion I in höherem Grade als Reaktion II.

Tabelle 4b.

20 ccm 10prozentige Glukoselösung, 10 ccm Wasser, 1 g abgepreßte Hefe.

Zeit in Minuten		Entwickelte CO_2		Drehungsänderung Δ		Diff. Δ—C
		ccm	%	in Graden	%	
1.	65	80	16,27	3,54 — 2,76 = 0,78	22,03	5,76
	105	101	20,48	3,54 — 2,49 = 1,05	29,66	9,18
2.	60	55	11,10	3,54 — 2,89 = 0,65	18,36	7,26
	90	76	15,50	3,54 — 2,56 = 0,98	27,68	12,16

Tabelle 5a.

20 ccm 10prozentige Glukoselösung, 2 ccm $^1/_2$ normale Ammoniumformiatlösung, 3 ccm Wasser, 1 g abgepreßte Hefe.

Zeit in Minuten		Entwickelte CO_2		Drehungsänderung Δ		Diff. Δ—C
		ccm	%	in Graden	%	
1.	100	171	32,46	4,56 — 2,46 = 2,10	46,05	13,59
	120	228	43,34	4,56 — 2,00 = 2,56	56,14	12,80
	160	309	58,63	4,56 — 1,35 = 3,21	70,40	11,77
2.	70	133	25,14	4,56 — 3,12 = 1,44	31,43	6,29
	100	196	37,09	4,56 — 2,49 = 2,07	45,40	8,31
	130	245	46,55	4,56 — 2,04 = 2,52	55,26	8,71

Tabelle 5b.

20 ccm 10prozentige Glukoselösung, 5 ccm Wasser, 1 g abgepreßte Hefe.

Zeit in Minuten		Entwickelte CO_2		Drehungsänderung Δ		Diff. Δ—C
		ccm	%	in Graden	%	
1.	100	118	22,47	4,56 — 3,10 = 1,46	32,02	9,55
	120	156	29,60	4,56 — 2,65 = 1,91	41,89	12,29
	160	207	39,23	4,56 — 2,28 = 2,28	50,00	10,77
2.	70	93	17,66	4,56 — 3,49 = 1,07	23,46	5,80
	100	132	25,08	4,56 — 3,13 = 1,43	31,38	6,30
	130	152	28,89	4,56 — 2,90 = 1,66	36,40	7,51

Tabelle 5c.

20 ccm 10 proz. Glukoselösung 1 g Hefe	Zeit in Min.	Entwickelte CO_2		Drehungsänderung Δ		Diff. Δ—C
		ccm	%	in Graden	%	
5 ccm Wasser	90	110	23,00	4,14 — 2,84 = 1,30	31,40	8,40
	125	149	31,18	4,14 — 2,40 = 1,74	42,03	10,85
	165	212	44,44	4,14 — 1,94 = 2,20	53,14	8,70
2 ccm 0,5 normale Ammoniumformiatlösung + 3 ccm Wasser	90	179	37,40	4,14 — 2,05 = 2,09	50,48	13,08
	125	237	49,51	4,14 — 1,60 = 2,54	61,34	11,83
	165	299	62,57	4,14 — 1,01 = 3,13	75,60	13,03

Es wurde nun versucht, ob nicht die kräftige Aktivierung, welche die alkoholische Gärung durch Alkali- und Ammoniumsalze aliphatischer Säuren erfährt[1]), sich vorzugsweise auf die Reaktion I erstreckt. Unsere Versuche beziehen sich auf Ammoniumformiat, welches eine starke aktivierende Wirkung auf gärende Hefe ausübt. Indessen zeigten sich auch hier, wie die Tabellen 5a bis 5c beweisen, nur unbedeutende Unterschiede in der Größe der beobachteten Differenz Δ—C. Die Versuche der Tabellen 5a bis 5c wurden mit der gleichen Hefe angestellt und zwar wurden zu den Versuchen I der Tabellen 5a und 5b die direkt aus der Würze kommende, gewaschene Hefe verwendet, während die Versuche der Tabelle 5c ausgeführt wurden, nachdem die Hefe drei Tage lang in Berührung mit Eiswasser gewesen war und dadurch sicher den allergrößten Teil ihres Glykogens verloren hatte. Abgesehen von dem Einfluß des Formiatzusatzes erwies sich die untersuchte Differenz Δ—C bei der frischen glykogenhaltigen Hefe ein wenig größer als bei der glykogenarmen. Bei letzterer stieg durch Zusatz des Formiats die Differenz Δ—C in etwas höherem Grade als dies bei der frischen Hefe der Fall war. In dieser Hinsicht sind also miteinander zu vergleichen: die unter 1 angeführten Versuche der Tabellen 5a und 5b und sämtliche Versuche der Tabelle 5c.

Tabelle 6.

50 ccm 20 proz. Glukoselösung 1 g abgepreßte Hefe	Zeit in Min.	Entwickelte CO_2		Drehungsänderung Δ		Diff. Δ—C
		ccm	%	in Graden	%	
Ohne Zusatz	240	237	9,22	10,85 — 9,55 = 1,30	11,98	2,76
	420	384	14,96	10,85 — 8,87 = 1,98	18,25	3,29
+ 2 ccm 0,5 normale Ammon.-Formiatlös.	240	354	13,79	10,43 — 8,46 = 1,97	18,92	5,13
	420	649	23,55	10,43 — 7,48 = 2,95	28,28	4,73

[1]) Euler und Cassel, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 86, 1913, S. 122.

Die vorstehende Tabelle 6 bildet noch insofern eine Bestätigung der vorhergehenden Ergebnisse, als auch hier durch Zusatz von Ammoniumformiat die Differenz Δ—C steigt.

Eine Vergrößerung der Differenz Δ—C wurde in der vorhergehenden Arbeit von Euler und Berggren bei Zusatz von Hefeextrakt bezw. von Co-Enzym (nach der Bezeichnung von Harden und Young) gefunden.

In einer in dieser Zeitschrift erschienenen Notiz[1]) heißt es bei einer Besprechung dieser Arbeit: „In dieser Zeitschrift sprechen Euler und Berggren auch über den Hefeextrakt. Ich möchte nun darauf hinweisen, daß der sog. Hefeextrakt nichts weiter ist, als der nach meiner von den Autoren etwas abgeänderten Methode dargestellte Hefemazerationssaft. Sie verwendeten ihn in abgekochtem Zustand."

Natürlich ist nichts dagegen einzuwenden, gekochten Hefeextrakt künftig „Mazerationssaft" zu nennen, wenn auch ein Vorteil der neuen Benennung nicht einzusehen ist. Daß ein solcher gekochter Extrakt von Trockenhefe, mit welchem ja zahlreiche Forscher gearbeitet haben, Co-Enzym enthält, haben Harden und Young[2]) zuerst mitgeteilt und sie haben diese wichtige Tatsache eingehend behandelt[3]).

Die beiden von Euler und Berggren gefundenen neuen Tatsachen sind die folgenden:

1. Durch den Extrakt getrockneter Hefe wird die durch lebende Hefe hervorgerufene Gärung um etwa 100 % beschleunigt.

2. Die bei der alkoholischen Gärung auftretende Differenz zwischen dem Rückgang der optischen Drehung einer gärenden Zuckerlösung und der entwickelten Kohlensäure wird durch Zusatz von Hefenextrakt um etwa 20 % vergrößert.

Die Einwirkung von Co-Enzym auf lebende Hefe ist zum erstenmal von Euler und Berggren studiert worden und speziell über den Einfluß des Co-Enzyms auf die Differenz Δ—C war vorher nicht das Geringste bekannt.

---

[1]) Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. II, 1912, S. 104.

[2]) Harden und Young, Journ. Physiol., Bd. 32, 1905; Proc. Roy. Soc., Bd. 21, 1905.

[3]) Harden und Young, Proc. Roy. Soc., Bd. 77, 78, 1906.

Zur Morphologie und Physiologie der Kahmhefen und der kahmhautbildenden Saccharomyceten.

II. Teil (Schluß).

Von **Richard Meißner.**

(Arbeiten aus der Kgl. Württembergischen Weinbau-Versuchsanstalt in Weinsberg.)

B. Die Ammonium-Chlorid-Reihe.

I. Versuchsreihe.

Die Nährlösung war die Nährlösung B, welche aber statt des Ammonium-Nitrates 5 ‰ Ammoniumchlorid enthielt. Die Kontrolllösungen enthielten folgende Mengen organischer Säuren:

Lösung	1:	4,99 ‰	Weinsäure	Auf Weinsäure berechnet, mit Lackmus als Indikator titriert.
„	2:	5,78 „	Äpfelsäure	
„	3:	6,23 „	Bernsteinsäure	
„	4:	5,14 „	Zitronensäure	
„	5:	6,53 „	Essigsäure	
„	6:	3,83 „	Milchsäure	

Jedes Kölbchen enthielt 60 ccm der betreffenden Nährlösung. Die Kölbchen wurden mit Wattestopfen verschlossen, im strömenden Dampf sterilisiert und dann am 16. März 1908 mit der Platinnadel aus fünf Tage alten Kulturen der Rassen Nr. 1, 3, 4, 5, 8, 15, 16, 21a, 32 und 43 geimpft. Die Beobachtungen des Wachstums der Kahmhefen ergaben folgende Resultate:

auf	am 18. März 1908	am 22. März 1908	am 19. Mai 1908	am 7. Juli 1908
Kahmhefe Nr. 1.				
Weinsäure . .	3/4 äußerst feine Decke	3/4 äußerst feine Decke mit dichteren Punkten	fast volle äußerst feine Decke	ganz zarte, dünne Decke

auf	am 18. März 1908	am 22. März 1908	am 19. Mai 1908	am 7. Juli 1908
Äpfelsäure . .	1/4 äußerst feine Decke	1/4 äußerst feine Decke	1/2 sehr feine Decke	einzelne, gut sichtbare Inseln[1])
Bernsteinsäure	desgl.	fast volle, sehr feine Decke	volle, sehr feine Decke	volle, sehr feine Decke (wenig entwickelt)
Zitronensäure .	1/2 sehr feine Decke	3/4 sehr feine Decke	desgl.	volle, sehr feine Decke (schwach entwickelt)
Essigsäure . .	etwas gewachsen	etwas gewachsen	desgl.	volle Decke, gut entwickelt
Milchsäure . .	1/2 feine Decke, mit dichteren Punkten	fast volle, sehr feine Decke	volle glatte Decke	desgl.

Kahmhefe Nr. 3.

auf	am 18. März 1908	am 22. März 1908	am 19. Mai 1908	am 7. Juli 1908
Weinsäure . .	1/4 äußerst feine Decke	1/4 äußerst feine Decke	volle, äußerst feine Decke	ganz zarte, dünne Decke
Äpfelsäure . .	etwas gewachsen	fast volle, sehr feine Decke	volle glatte Decke	volle Decke, gut entwickelt
Bernsteinsäure	1/8 sehr feine Decke	1/3 sehr feine Decke	desgl.	desgl.
Zitronensäure .	3/4 sehr feine Decke	3/4 sehr feine Decke	volle, sehr feine Decke	volle, feine Decke
Essigsäure . .	fast volle, sehr feine Decke	dicke, gerunzelte Decke	volle, gerunzelte Decke	volle Decke, gut entwickelt
Milchsäure . .	1/4 sehr feine Decke	volle feine Decke	volle glatte Decke	desgl.

Kahmhefe Nr. 4.

auf	am 18. März 1908	am 22. März 1908	am 19. Mai 1908	am 7. Juli 1908
Weinsäure . .	etwas gewachsen	kaum gewachsen	volle, sehr feine Decke	Decke inselförmig
Äpfelsäure . .	desgl.	volle, zart gefaltete Decke	volle Decke	volle Decke, gut entwickelt
Bernsteinsäure	1/10 feine Decke	desgl.	desgl.	desgl.
Zitronensäure .	1/16 feine Decke	desgl.	desgl.	desgl.
Essigsäure . .	etwas gewachsen	1/32 sehr feine Decke	desgl.	desgl.
Milchsäure . .	1/8 feine Decke	volle, zart gefaltete Decke	desgl.	desgl.

[1]) Die Decke ist allmählich zu Boden des Kölbchens bis auf die beobachteten Deckeninseln gesunken.

auf	am 18. März 1908	am 22. März 1908	am 19. Mai 1908	am 7. Juli 1908
Kahmhefe Nr. 5.				
Weinsäure . .	kaum gewachsen	kaum gewachsen	wenig gewachsen	sehr schwache Entwicklung
Äpfelsäure . .	etwas gewachsen	etwas gewachsen	desgl.	ganz schwache Entwicklung
Bernsteinsäure	desgl.	desgl.	desgl.	sehr wenig entwickelt; einzelne Inseln
Zitronensäure .	kaum gewachsen	kaum gewachsen	desgl.	schwache, dünne Decke
Essigsäure . .	etwas gewachsen	desgl.	$^1/_4$ sehr feine Decke	$^1/_4$ Decke, inselförmig
Milchsäure . .	desgl.	Kolonie 1 cm Durchmesser	$^1/_8$ sehr feine Decke	schwach entwickelt, einzelne Inseln
Kahmhefe Nr. 8.				
Weinsäure . .	etwas gewachsen	—	—	sehr schwache Entwicklung
Äpfelsäure . .	$^1/_4$ äußerst feine Decke	—	—	$^3/_4$ ganz zarte Decke
Bernsteinsäure	$^1/_{10}$ sehr feine Decke	—	—	$^1/_2$ schwache Decke
Zitronensäure .	schwach entwickelt	—	—	ganz schwache Entwicklung
Essigsäure . .	desgl.	—	—	schwach entwickelt
Milchsäure . .	$^1/_4$ feine Decke	—	—	$^1/_4$ feine Decke
Kahmhefe Nr. 15.				
Weinsäure . .	kaum gewachsen	kaum gewachsen	fast volle, sehr feine Decke	$^7/_8$ feine Decke
Äpfelsäure . .	etwas gewachsen	etwas gewachsen	volle glatte Decke	volle Decke, gut entwickelt
Bernsteinsäure	desgl.	desgl.	desgl.	zur Zeit auf der Oberfläche wenig Inseln, aber viel Bodensatz
Zitronensäure .	desgl.	desgl.	fast volle, sehr feine Decke	volle Decke, schwach entwickelt
Essigsäure . .	$^1/_3$ feine Decke	volle gefaltete Decke	volle Decke	volle Decke, gut entwickelt
Milchsäure . .	$^1/_2$ sehr feine Decke	$^1/_2$ sehr feine Decke	volle glatte Decke	desgl.

auf	am 18. März 1908	am 22. März 1908	am 19. Mai 1908	am 7. Juli 1908
Kahmhefe Nr. 16.				
Weinsäure . .	etwas gewachsen	etwas gewachsen	etwas gewachsen	1/2 Decke, inselförmig
Äpfelsäure . .	desgl.	volle, feine Decke	volle glatte Decke	volle Decke, gut entwickelt
Bernsteinsäure	1/2 äußerst feine Decke	4/5 sehr feine Decke	desgl.	desgl.
Zitronensäure .	fast volle, äußerst feine Decke	fast volle, äußerst feine Decke	volle, sehr feine Decke	volle Decke, schwach entwickelt, inselförmig
Essigsäure . .	etwas gewachsen	volle, gerunzelte Decke	volle, stark gerunzelte Decke	volle Decke, gut entwickelt
Milchsäure . .	1/8 sehr feine Decke	volle, gefaltete Decke	volle wenig gefaltete Decke	desgl.
Kahmhefe Nr. 21a.				
Weinsäure . .	etwas gewachsen	gewachsen	volle, sehr feine Decke	3/4 Decke, inselförmig[1])
Äpfelsäure . .	desgl.	2/3 sehr feine Decke	volle glatte Decke	volle Decke, gut entwickelt
Bernsteinsäure	1/5 sehr feine Decke	1/2 sehr feine Decke	volle, sehr feine Decke	desgl.
Zitronensäure .	3/4 äußerst feine Decke	3/4 äußerst feine Decke	desgl.	volle feine Decke
Essigsäure . .	1/4 sehr feine Decke	volle, dick gefaltete Decke	volle, gerunzelte Decke	volle Decke, gut entwickelt
Milchsäure . .	fast volle, sehr feine Decke	volle, sehr zart gefaltete Decke	volle, zart gefaltete Decke	desgl.
Kahmhefe Nr. 32.				
Weinsäure . .	—	—	—	3/4 ganz feine Decke
Äpfelsäure . .	—	—	—	1/2 zarte Decke
Bernsteinsäure	—	—	—	1/2 schwache Decke
Zitronensäure .	—	—	—	1/8 schwache Decke
Essigsäure . .	—	—	—	ganz feine, schwach entwickelte Decke
Milchsäure . .	—	—	—	3/4 mittelstark entwickelte Decke

[1]) Wenn bei späterer Beobachtung weniger Deckenbildung gefunden wird, so hat es seinen Grund darin, daß die Decke in die Flüssigkeit gesunken ist.

auf	am 18. März 1908	am 22. März 1908	am 19. Mai 1908	am 7. Juli 1908
Kahmhefe Nr. 43.				
Weinsäure . .	—	—	—	schwach entwickelt
Äpfelsäure . .	—	—	—	sehr schwache Entwicklung
Bernsteinsäure	—	—	—	desgl.
Zitronensäure .	—	—	—	desgl.
Essigsäure . .	—	—	—	desgl.
Milchsäure . .	—	—	—	desgl.

2. Versuchsreihe.

Die Kulturen der 1. Versuchsreihe wurden mit Ausnahme der schlecht entwickelten Kulturen in Nährlösungen gleicher Zusammensetzung am 7. Juli 1908, nachmittags 5 Uhr, übergeimpft, und zwar mit der Platinnadel, nur bei schwach entwickelten Kulturen mit der Platinöse. Die Beobachtungen des Wachstums der Kahmhefen ergaben folgende Resultate:

auf	am 11. Juli 1908	am 16. November 1908
Kahmhefe Nr. 1.		
Weinsäure	nicht gewachsen	etwas gewachsen
Äpfelsäure	desgl.	volle Decke, gute Entwickelung
Bernsteinsäure . .	sehr wenig gewachsen	desgl.
Zitronensäure . . .	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Essigsäure	—	volle Decke
Milchsäure	sehr wenig gewachsen	volle Decke, gute Entwickelung
Kahmhefe Nr. 3.		
Weinsäure	$^1/_{32}$ Decke	$^1/_2$ feine Decke
Äpfelsäure	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Bernsteinsäure . .	$^1/_{32}$ Decke	volle Decke
Zitronensäure . . .	$^1/_{16}$ Decke	$^1/_4$ Decke
Essigsäure	$^1/_8$ Decke	volle Decke
Milchsäure	$^1/_4$ Decke	desgl.
Kahmhefe Nr. 4.		
Weinsäure	$^3/_4$ Decke	$^1/_2$ Decke
Äpfelsäure	wenig gewachsen	volle Decke
Bernsteinsäure . .	volle Decke	desgl.
Zitronensäure . . .	$^1/_8$ Decke	desgl.
Essigsäure	nicht gewachsen	nicht gewachsen
Milchsäure	über $^1/_2$ Decke	volle Decke

auf	am 11. Juli 1908	am 16. November 1908
Kahmhefe Nr. 5.		
Weinsäure	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Äpfelsäure	—	—
Bernsteinsäure . .	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Zitronensäure . . .	nicht gewachsen	desgl.
Essigsäure	desgl.	$^1/_8$ Decke
Milchsäure	sehr wenig gewachsen	$^1/_2$ Decke
Kahmhefe Nr. 8.		
Weinsäure	nicht gewachsen	sehr wenig gewachsen
Äpfelsäure	desgl.	desgl.
Bernsteinsäure . .	desgl.	$^1/_{32}$ Decke
Zitronensäure . . .	—	—
Essigsäure	—	—
Milchsäure	nicht gewachsen	$^1/_2$ Decke
Kahmhefe Nr. 15.		
Weinsäure	$^1/_2$ Decke	$^3/_4$ Decke
Äpfelsäure	wenig gewachsen	volle Decke
Bernsteinsäure . .	$^3/_4$ Decke	desgl.
Zitronensäure . . .	$^1/_{16}$ Decke	$^1/_5$ Decke
Essigsäure	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Milchsäure	desgl.	volle Decke
Kahmhefe Nr. 16.		
Weinsäure	über $^1/_2$ ganz feine, dünne Decke	$^1/_2$ Decke
Äpfelsäure	$^1/_{16}$ Decke	volle Decke
Bernsteinsäure . .	nicht gewachsen	desgl.
Zitronensäure . . .	$^1/_8$ Decke	nicht ganz $^1/_2$ Decke
Essigsäure	$^1/_2$ ganz feine, dünne Decke	volle Decke
Milchsäure	über $^1/_2$ ganz feine Decke	desgl.
Kahmhefe Nr. 21a.		
Weinsäure	$^1/_4$ Decke	$^1/_4$ Decke
Äpfelsäure	wenig gewachsen	volle Decke
Bernsteinsäure . .	$^7/_8$ Decke	desgl.
Zitronensäure . . .	$^1/_8$ Decke	$^1/_2$ Decke
Essigsäure	volle Decke	volle Decke
Milchsäure	$^1/_4$ Decke	desgl.
Kahmhefe Nr. 32.		
Weinsäure	nicht gewachsen	wenig gewachsen
Äpfelsäure	wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Bernsteinsäure . .	desgl.	$^1/_2$ Decke
Zitronensäure . . .	—	—
Essigsäure	nicht gewachsen	wenig gewachsen
Milchsäure	$^1/_{32}$ Decke	$^1/_2$ Decke

auf	am 11. Juli 1908	am 16. November 1908
Kahmhefe Nr. 43.		
Weinsäure	nicht gewachsen	wenig gewachsen
Äpfelsäure	sehr wenig gewachsen	$^1/_4$ Decke
Bernsteinsäure	desgl.	wenig gewachsen
Zitronensäure	—	—
Essigsäure	sehr wenig gewachsen	wenig gewachsen
Milchsäure	wenig gewachsen	desgl.

3. Versuchsreihe.

Am 16. November 1908 wurden die Kulturen der 2. Versuchsreihe in frische Nährlösung mit folgenden Säuregehalten übergeimpft:

Lösung	1:	5,18 ‰	Weinsäure	auf Weinsäure berechnet, mit Lackmus als Indikator titriert.
„	2:	5,78 ‰	Äpfelsäure	
„	3:	6,30 ‰	Bernsteinsäure	
„	4:	5,70 ‰	Zitronensäure	
„	5:	6,60 ‰	Essigsäure	
„	6:	4,43 ‰	Milchsäure	

Das Überimpfen der Kahmhefen geschah bei genügender Entwickelung der Kulturen der 2. Versuchsreihe mit einer Platinnadel, bei geringer Entwickelung mit einer Platinöse. Die Beobachtungen des Wachstums der Kahmhefen ergaben folgende Resultate:

auf	am 24. November 1908	am 16. Dezember 1908
Kahmhefe 1.		
Weinsäure	—	—
Äpfelsäure	gewachsen in zahlreichen Kolonien	volle Decke
Bernsteinsäure	doppelt erbsengroße Decke	desgl.
Zitronensäure	—	—
Essigsäure	wenig gewachsen	volle Decke
Milchsäure	sehr wenig gewachsen	etwas gewachsen
Kahmhefe 3.		
Weinsäure	sehr wenig gewachsen	wenig gewachsen
Äpfelsäure	—	—
Bernsteinsäure	nicht gewachsen	etwas gewachsen
Zitronensäure	$^1/_{32}$ Decke	$^1/_{16}$ Decke
Essigsäure	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Milchsäure	$^1/_8$ Decke und strahlenförmig vom Boden des Kölbchens an den Glaswandungen empor	volle Decke

auf	am 24. November 1908	am 16. Dezember 1908
Kahmhefe 4.		
Weinsäure	nicht gewachsen	etwas gewachsen
Äpfelsäure	volle Decke	volle Decke
Bernsteinsäure	desgl.	desgl.
Zitronensäure	desgl.	desgl.
Essigsäure	—	—
Milchsäure	volle Decke	volle Decke
Kahmhefe 5.		
Weinsäure	—	—
Äpfelsäure	—	—
Bernsteinsäure	—	—
Zitronensäure	—	—
Essigsäure	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Milchsäure	nicht gewachsen	desgl.
Kahmhefe 8.		
Weinsäure	nicht gewachsen	—
Äpfelsäure		—
Bernsteinsäure		nicht gewachsen
Zitronensäure		—
Essigsäure		—
Milchsäure		etwas gewachsen
Kahmhefe 15.		
Weinsäure	nicht gewachsen	nicht gewachsen
Äpfelsäure	volle Decke	volle Decke
Bernsteinsäure	zahlreiche erbsengroße Kolonien	desgl.
Zitronensäure	nicht gewachsen	gewachsen in zahlreichen kleinen Deckeninseln
Essigsäure	—	—
Milchsäure	$^1/_{16}$ Decke	volle Decke
Kahmhefe 16.		
Weinsäure	$^1/_{32}$ Decke	$^1/_{16}$ Decke
Äpfelsäure	sehr wenig gewachsen	gut gewachsen, aber am Boden des Kölbchens
Bernsteinsäure	$^3/_4$ Decke	volle Decke
Zitronensäure	$^1/_{16}$ Decke	$^1/_{16}$ Decke
Essigsäure	wenig gewachsen	gut gewachsen, namentlich am Boden des Kölbchens
Milchsäure	volle Decke	volle Decke

auf	am 24. November 1908	am 16. Dezember 1908
Kahmhefe 21a.		
Weinsäure	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Äpfelsäure	desgl.	desgl.
Bernsteinsäure	wenig gewachsen	gut gewachsen, aber am Boden des Kölbchens
Zitronensäure	desgl.	gewachsen
Essigsäure	sehr wenig gewachsen	wenig gewachsen
Milchsäure	nahezu volle Decke	volle Decke
Kahmhefe 32.		
Weinsäure	—	—
Äpfelsäure	—	—
Bernsteinsäure	sehr wenig gewachsen	gut gewachsen
Zitronensäure	—	—
Essigsäure	—	—
Milchsäure	sehr wenig gewachsen	gewachsen in verschiedenen größeren Kolonien
Kahmhefe 43.		
Weinsäure	—	—
Äpfelsäure	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Bernsteinsäure	—	—
Zitronensäure	—	—
Essigsäure	—	—
Milchsäure	—	—

Wir sehen demnach, daß die Kahmhefen bei fortgesetzter Kultur auf künstlichen Ammonchlorid-Nährlösungen, besonders auf solchen, die als Quelle organischer Substanz Äpfelsäure, Milchsäure oder Bernsteinsäure enthalten, meist sehr gut wachsen können. Die Zitronensäure wird, wie bei der Ammoniumnitrat-Reihe von Kahmhefe Nr. 4 sehr gut verwertet. Eine mikroskopische Untersuchung der Kahmhefen ergab nach dem Protokoll vom 24. November 1908 die gleichen Resultate, wie bei der Ammoniumnitrat-Reihe.

C. Die Ammoniumphosphat-Reihe.

I. Versuchsreihe.

Zur Verwendung gelangt wieder Nährlösung B, die als Stickstoffquelle 5 ‰ Ammoniumphosphat und als Kohlenstoffquelle folgende Säuren enthielt:

Lösung 1:	4,92 ‰ Weinsäure	auf Weinsäure berechnet, mit Lackmus als Indikator titriert.
„ 2:	5,44 ‰ Äpfelsäure	
„ 3:	6,15 ‰ Bernsteinsäure	
„ 4:	5,96 ‰ Zitronensäure	
„ 5:	6,19 ‰ Essigsäure	
„ 6:	4,80 ‰ Milchsäure	

Je 90 ccm dieser Lösungen, die sich in 200 ccm-Kölbchen befanden, wurden sterilisiert, nachdem die Kölbchen mit Wattestopfen versehen waren, und nach dem Erkalten am 7. Juli 1908 mit Kulturen vom 12. Mai 1908 der Kahmheferassen Nr. 1, 3, 4, 5, 8, 15, 16, 21a, 32 und 43 mit Hilfe einer Platinnadel geimpft. Die Beobachtungen ergaben folgende Resultate:

auf	am 11. Juli 1908	am 25. Juli 1908
Kahmhefe Nr. 1 [1].		
Weinsäure	etwas gewachsen	wenig gewachsen
Äpfelsäure	desgl.	desgl.
Bernsteinsäure . .	desgl.	desgl.
Zitronensäure . . .	nicht gewachsen	nicht gewachsen
Essigsäure	etwas gewachsen	gewachsen
Milchsäure	desgl.	wenig gewachsen
Kahmhefe Nr. 3.		
Weinsäure	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Äpfelsäure	nahezu volle Decke	volle, glatte Decke
Bernsteinsäure . .	desgl.	desgl.
Zitronensäure . . .	sehr wenig gewachsen	wenig gewachsen
Essigsäure	volle Decke	volle, etwas gefaltete Decke
Milchsäure	$^1/_2$ Decke	volle gefaltete Decke
Kahmhefe Nr. 4.		
Weinsäure	$^1/_8$ Decke	$^1/_4$ Decke
Äpfelsäure	gewachsen (Bodensatz)	volle Decke
Bernsteinsäure . .	wenig gewachsen (Bodensatz)	volle, glatte Decke
Zitronensäure . . .	wenig gewachsen	volle Decke
Essigsäure	$^1/_8$ Decke	desgl.
Milchsäure	$^1/_{10}$ Decke	volle, etwas gefaltete Decke

[1]) Wird nicht wieder übergeimpft wegen des geringen Wachstums.

auf	am 11. Juli 1908	am 25. Juli 1908
Kahmhefe Nr. 5 [1]).		
Weinsäure	sehr wenig gewachsen	etwas gewachsen
Äpfelsäure	desgl.	sehr wenig gewachsen
Bernsteinsäure . .	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Zitronensäure . . .	sehr wenig gewachsen	desgl.
Essigsäure	desgl.	desgl.
Milchsäure	$^1/_{10}$ sehr feine Decke	gewachsen
Kahmhefe Nr. 8 [1]).		
Weinsäure	sehr wenig gewachsen	wenig gewachsen
Äpfelsäure	desgl.	sehr wenig gewachsen
Bernsteinsäure . .	desgl.	wenig gewachsen
Zitronensäure . . .	desgl.	desgl.
Essigsäure	nicht gewachsen	desgl.
Milchsäure	sehr wenig gewachsen	desgl.
Kahmhefe Nr. 15.		
Weinsäure	wenig gewachsen	$^1/_2$ Decke
Äpfelsäure	desgl.	$^1/_4$ Decke
Bernsteinsäure . .	desgl.	wenig gewachsen
Zitronensäure . . .	desgl.	desgl.
Essigsäure	volle Decke	volle, gefaltete Decke
Milchsäure	$^3/_4$ Decke	desgl.
Kahmhefe Nr. 16.		
Weinsäure	$^1/_8$ Decke	wenig gewachsen
Äpfelsäure	$^1/_2$ dünne Decke	$^3/_4$ Decke
Bernsteinsäure . .	$^1/_8$ dünne Decke	desgl.
Zitronensäure . . .	$^1/_3$ zarte Decke	wenig gewachsen
Essigsäure	nahezu volle Decke	volle, gefaltete Decke
Milchsäure	nahezu volle, dünne Decke	desgl.
Kahmhefe Nr. 21a.		
Weinsäure	$^1/_3$ Decke	$^1/_3$ Decke
Äpfelsäure	über $^1/_2$ Decke	volle Decke
Bernsteinsäure . .	$^1/_2$ Decke	nahezu volle Decke
Zitronensäure . . .	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Essigsäure	volle Decke	volle, gefaltete Decke
Milchsäure	desgl.	desgl.

[1]) Wird nicht wieder übergeimpft wegen des geringen Wachstums.

auf	am 11. Juli 1908	am 25. Juli 1908
Kahmhefe Nr. 32 [1]).		
Weinsäure . . .	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Äpfelsäure . . .	desgl.	desgl.
Bernsteinsäure . .	desgl.	desgl.
Zitronensäure . .	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Essigsäure	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Milchsäure	desgl.	desgl.
Kahmhefe Nr. 43 [1]).		
Weinsäure	1/4 Decke	1/8 Decke
Äpfelsäure	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Bernsteinsäure . .	desgl.	desgl.
Zitronensäure . . .	wenig gewachsen	wenig gewachsen
Essigsäure	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Milchsäure	desgl.	wenig gewachsen

2. Versuchsreihe.

Am 25. Juli 1908 wurden die Kulturen der Kahmhefen Nr. 3, 4, 15, 16 und 21a, welche in der ersten Versuchsreihe gut gewachsen waren, in frische sterile Nährlösungen derselben Zusammensetzung wie vorher übergeimpft. Am 26. November 1908 wurde das Wachstum der Kahmhefen kontrolliert und es zeigten sich dabei folgende Ergebnisse:

Kahm-heferasse	auf Wein-säure	auf Äpfel-säure	auf Bern-steinsäure	auf Zitronen-säure	auf Essig-säure	auf Milch-säure
Nr. 3	1/6 Decke	volle Decke	volle Decke	1/4 Decke	volle Decke	volle Decke
Nr. 4	1/8 Decke	desgl.	desgl.	volle Decke	desgl.	desgl.
Nr. 15	1/6 Decke	desgl.	desgl.	1/5 Decke	desgl.	desgl.
Nr. 16	1/4 Decke	desgl.	desgl.	1/10 Decke	desgl.	desgl.
Nr. 21a	nahezu volle Decke	desgl.	desgl.	etwa 1/2 Decke	desgl.	desgl.

3. Versuchsreihe.

Am 16. November 1908 wurden die Kulturen der zweiten Versuchsreihe mittels einer Platinnadel in frische Nährlösungen (Nährlösung B mit Ammoniumphosphat) übergeimpft, die folgende Säuregehalte aufwiesen:

---

[1]) Wird nicht wieder übergeimpft wegen des geringen Wachstums.

Lösung 1:	5,63 ‰	Weinsäure	auf Weinsäure berechnet, mit Lackmus als Indikator titriert.
„ 2:	6,38 „	Äpfelsäure	
„ 3:	6,83 „	Bernsteinsäure	
„ 4:	5,70 „	Zitronensäure	
„ 5:	6,83 „	Essigsäure	
„ 6:	5,18 „	Milchsäure	

Die Beobachtungen des Wachstums der Kahmhefen ergaben folgende Resultate:

auf	am 24. November 1908	am 16. Dezember 1908
	Kahmhefe 3.	
Weinsäure	wenig gewachsen	gut gewachsen
Äpfelsäure	volle Decke	volle Decke
Bernsteinsäure . . .	wenig gewachsen	gut gewachsen, größere Kolonien
Zitronensäure . . .	desgl.	gut gewachsen
Essigsäure	desgl.	volle Decke
Milchsäure	$^{8}/_{4}$ Decke	desgl.
	Kahmhefe 4.	
Weinsäure	sehr wenig gewachsen	Zahlreiche, sehr kleine Deckenkolonien
Äpfelsäure	volle Decke	volle Decke
Bernsteinsäure . . .	desgl.	desgl.
Zitronensäure . . .	desgl.	desgl.
Essigsäure	wenig gewachsen	desgl.
Milchsäure	volle Decke	desgl.
	Kahmhefe 15.	
Weinsäure	nicht gewachsen	sehr wenig gewachsen
Äpfelsäure	volle Decke	volle Decke
Bernsteinsäure . . .	sehr wenig gewachsen	sehr wenig gewachsen
Zitronensäure . . .	desgl.	desgl.
Essigsäure	desgl.	gut gewachsen (Bodensatz)
Milchsäure	wenig gewachsen	volle Decke
	Kahmhefe 16.	
Weinsäure	10 kleine Kolonien gewachsen	$^{1}/_{32}$ Decke
Äpfelsäure	$^{4}/_{5}$ Decke	volle Decke
Bernsteinsäure . . .	volle Decke	desgl.
Zitronensäure . . .	40 kleine Kolonien gewachsen	$^{1}/_{16}$ Decke
Essigsäure	wenig gewachsen	gut gewachsen, aber nur am Boden des Kölbchens
Milchsäure	volle Decke	volle Decke

auf	am 24. November 1908	am 16. Dezember 1908
	Kahmhefe 21a.	
Weinsäure	zahlreiche einzelne Deckenkolonien	Zahlreiche Kolonien, die etwa $^{1}/_{8}$ Oberfläche der Nährlösung bedecken
Äpfelsäure	volle Decke	volle Decke
Bernsteinsäure . . .	desgl.	desgl.
Zitronensäure . . .	wenig gewachsen	6 Kolonien von Erbsengröße
Essigsäure	volle Decke	volle Decke
Milchsäure	desgl.	desgl.

Trotz mehrfachen Überimpfens derjenigen Kulturen, die auf künstlicher Nährlösung gewachsen sind, auf frische künstliche sterile Nährlösung derselben oder ähnlicher Zusammensetzung können also die Kahmhefen auf diesen gut wachsen, ob nun Ammoniumphosphat oder Ammoniumchlorid oder Ammoniumnitrat als Stickstoffquelle in den Nährflüssigkeiten vorhanden ist. Die organischen Säuren werden durch die Lebenstätigkeit dieser Organismen in geringerem oder größerem Maße zerstört und auch zum Aufbau neuer Zellen verwendet.

Zusammenfassung.

Die gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen sich kurz dahin zusammenfassen:

1. Einige Rassen der Kahmhefen und der kahmhautbildenden Saccharomyceten wachsen auf künstlichen Nährlösungen, welche als alleinige Quelle kohlenstoffhaltiger Substanz organische Säuren (Äpfel-, Bernstein-, Milch-, Essig-, Zitronen- oder Weinsäure) je getrennt enthalten, recht gut, andere Rassen zeigen dagegen ein geringeres Wachstum. Eine Rasse kann meist auf mehreren organischen Säuren gleich gut oder gleich schlecht wachsen.

2. Im allgemeinen wachsen die Kahmhefen auf Weinsäure-Nährlösungen verschiedenster Konzentration nur schlecht. Etwas besser ist das Wachstum dieser Organismen auf Zitronensäure-Nährlösung; nur Willia anomala zeigte auf letzterer Lösung ein recht gutes Wachstum. Am günstigsten war für das Wachstum der Kahmhefen die Milchsäure-Nährlösung, dann die Bernstein- und Äpfelsäurelösung, für manche Rassen selbst die Essigsäure-Nährlösung in einer bestimmten Konzentration.

3. Eine Kahmheferasse kann infolge ihres verschiedenen Wachstums auf den Nährlösungen die verschiedenen organischen Säuren in verschiedenem Grade verbrauchen, da mit dem stärkeren oder geringeren Wachstum dieser Organismen ein stärkerer oder geringerer Verbrauch der Säuren Hand in Hand geht.

4. Bei der Kombination zweier organischer Säuren in der Nährflüssigkeit übten die Wein- und Zitronensäure einen hemmenden Einfluß auf die Vermehrungsgeschwindigkeit mancher Kahmheferassen aus.

5. Wird eine Säure, auf der die Kahmhefen schlecht wachsen, mit einer Säure in der Nährlösung kombiniert, auf der sie gutes Wachstum zeigen, so verzehren die Kahmhefen die für ihr Wachstum günstige Säure und lassen die für sie ungünstige Säure in der Nährlösung zurück.

6. Bei der Kombination zweier Säuren, auf denen die Kahmhefen gut wachsen, tritt in den meisten Fällen eine Erhöhung des Kahmhefewachstums und ein vollständiger Verbrauch der beiden dargebotenen organischen Säuren ein. Die verschiedenen organischen Säuren sind entweder Substanzen, die in konzentrierterer Form ein besseres Wachstum der Kahmhefen bedingen als in weniger konzentrierter, oder es kann auch dieselbe organische Säure in konzentrierterer Form auf das Wachstum der verschiedenen Kahmhefen bald hemmend, bald neutral wirken.

7. Die Bedeutung der sechs untersuchten organischen Säuren für die Kahmhefen selbst liegt darin, daß diese Säuren von den verschiedenen Kahmheferassen in ihre Lebensprozesse (Ernährung, Wachstum, Atmung, Vermehrung) hineingezogen, dabei zerstört und in andere chemische Verbindungen umgewandelt werden.

8. Dasselbe gilt für andere organische Bestandteile des Mostes und Weines, wie für Trauben- und Rohrzucker, Alkohol und Glyzerin.

9. Als Stickstoffquelle erwies sich das salpetersaure Ammonium bei Gegenwart gewisser organischer Säuren für bestimmte Kahmheferassen als eine schlechtere als das phosphorsaure Ammonium. Aber sowohl das Ammoniumphosphat und Ammoniumnitrat, als auch das Ammoniumchlorid sind gute Stickstoffquellen für das Leben der Kahmhefen. Weinsaures Ammonium und Asparagin sind im allgemeinen schlechte Stickstoffquellen für diese Organismen. Das Asparagin wurde nur von Willia anomala gut verarbeitet.

10. Bei mehrfacher Überimpfung derjenigen Kahmhefen, die auf künstlicher Nährlösung gewachsen waren, auf frische, künstliche sterile Nährlösung derselben oder ähnlicher Zusammensetzung können die Kahmhefen gleich gut wachsen, ob nun Ammoniumphosphat oder Ammoniumnitrat oder Ammoniumchlorid in den Nährlösungen vorhanden ist. Die organischen Säuren werden dabei jedesmal durch die Lebenstätigkeit der Kahmhefen in geringerem oder größerem Grade zerstört und werden u. a. zum Aufbau neuer Zellen verwendet.

In der vorliegenden Abhandlung wurden besonders die Wachstums-Verhältnisse einiger Kahmheferassen auf säurehaltigen künstlichen Nährlösungen erörtert, um hierdurch das Wesen der Säureverminderung des Mostes und Weines durch die Kahmhefen und die Bedeutung der organischen Säuren für das Leben derselben aufzufinden. Aufgabe weiterer Untersuchungen wird es sein müssen, die Zersetzungsprodukte der organischen Säuren durch die Kahmhefen und die kahmhautbildenden Saccharomyceten kennen zu lernen.

Milchsäure in eingesäuertem Mais.

Von **Arthur W. Dox** und **Ray E. Neidig.**

(Aus der chemischen Abteilung der landwirtschaftlichen Versuchsstation zu Iowa.)

In einer vorigen Mitteilung[1]) wurde über das Studium der flüchtigen Fettsäuren in eingesäuertem Mais ausführlich berichtet. Es wurde gezeigt, daß Essigsäure und Propionsäure in beträchtlichen Mengen vorhanden sind, während die höheren Glieder der Reihe, wie Buttersäure, widerwärtige Eigenschaften zu verleihen scheinen und deren Gegenwart als Beweis beginnenden Verderbens anzunehmen sei. Die gesamte flüchtige Säure, welche durch Destillation gewonnen wurde, erklärte jedoch in keinem Falle die Gegenwart aller Säure, welche sich bei der direkten Titrierung des ursprünglichen Sauermaissaftes vorfand. Die Differenz repräsentiert daher nichtflüchtige Säure, welche bisher als vornehmlich aus Milchsäure bestehend angesehen wurde. Da die nichtflüchtige Säure, nach der indirekten Methode bestimmt, in den meisten von unseren Proben im Übermaß zu der flüchtigen Säure gegenwärtig war, so hielten wir es für wohl gerechtfertigt, hierüber weitere Studien anzustellen.

Nach den Resultaten anderer Forscher ist das Verhältnis der nichtflüchtigen zu der flüchtigen Säure keineswegs gleichbleibend. Da nun eingesäuertes Mais unter verschiedenen Bedingungen und aus Mais in verschiedenem Grade der Reife zubereitet wird, so ist es nicht zu verwundern, daß Variationen in der chemischen Zusammensetzung vorkommen. Es wird aber allgemein zugegeben, daß normalerweise die vorhandene nichtflüchtige Säure im Übermaß zu der flüchtigen Säure steht. Alle die bisher gesammelten Ergebnisse in bezug auf nichtflüchtige Säure in eingesäuertem Mais, obgleich als Milchsäure berechnet, gründen sich auf den Unterschied der Titrierungszahlen vor und nach

---

[1]) Iowa Agricultural Experiment Station, Research Bulletin, Nr. 7.

der Destillation der Probe mit Dampf. Um festzustellen, wie viel von diesem Gehalt an nichtflüchtiger Säure wirklich von Milchsäure herrührt, sind weit zuverlässigere Methoden nötig. Solche Methoden sind aber unseres Wissens bisher für die Bestimmung von Milchsäure in eingesäuertem Mais noch nicht angewendet worden.

Für die quantitative Bestimmung von Milchsäure sind verschiedene Methoden vorgeschlagen worden. Die Methode von Palm[1]) gründet sich auf die Unlöslichkeit des basischen Bleisalzes in Alkohol. In der Methode von Partheil[2]) wird die Flüchtigkeit der Milchsäure in überhitztem Dampf vorteilhaft benutzt. Die Zinklaktat-Methode[3]) erfordert die Isolierung dieses Salzes und die direkte Abwägung desselben. Diese drei Methoden sind von Suzuki und Hart[4]) miteinander verglichen und die letztgenannte als die befriedigendste erklärt worden. Eine Anzahl indirekter Methoden sind vorgeschlagen worden, in welchen Milchsäure entweder zu Azetaldehyd oder zu Oxalsäure oxydiert und das Oxydationsprodukt bestimmt wird. In unserer Arbeit wurde durchweg von der Zinklaktat-Methode Gebrauch gemacht. Dieselbe ist einfach und direkt, da sie nur die Ausscheidung der Säure vermittels Äthers und die Darstellung und Kristallisation des Zinksalzes verlangt. Das hierdurch gewonnene Zinksalz kann sodann für optische Studien verwendet werden.

Mögliche Quellen der Milchsäure.

1. Milchsäure kann aus Aminosäuren entstehen durch Austausch der primären Amingruppe gegen Hydroxyl im Alanin, und durch diese Reaktion und gleichzeitige Reduktion des Kohlenstoffatoms im Cystin und Serin. Ehrlich und Jacobsen[5]) haben nachgewiesen, daß drei Derivate von Alanin, nämlich Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan durch die Wirkung von Mikroorganismen in die entsprechenden Derivate der Milchsäure, nämlich p-Oxyphenylmilchsäure, Phenylmilchsäure und Indolmilchsäure verwandelt werden. Da nun aber die Aminosäuren, welche durch die Spaltung von Proteinen entstehen, optisch aktiv sind, so würden auch die davon abgeleiteten Milchsäuren optische Aktivität aufweisen.

---

[1]) Palm, Zeitschr. f. Anal. Chem. Bd. 22, S. 223.
[2]) Partheil, Zeitschr. f. Unters. der Nahrungs- u. Genußm., Bd. 5, S. 1056.
[3]) Buchner u. Meisenheimer, Ber. d. D. Chem. Ges., Bd. 37, S. 417.
[4]) Suzuki und Hart, Journ. Am. Chem. Soc., Bd. 31, S. 1364.
[5]) Ehrlich und Jacobsen, Berichte d. D. chem. Ges., Bd. 44, S. 888.

2. Bakterien, welche lösliche Kohlenhydrate in Milchsäure vergären, sind sehr zahlreich und in der Natur weit verbreitet. Esten und Mason[1]) haben diese Organismen in enormer Anzahl in eingesäuertem Mais gefunden, und es würde erscheinen, daß die Tätigkeit dieser Milchsäurebakterien unabhängig, obwohl gleichzeitig mit der Bildung von flüchtigen Säuren durch andere Organismen vor sich geht. Reinkulturen erzeugen oft optisch aktive Milchsäuren, obwohl die Gärung nach zufälliger Impfung fast immer in einer razemischen Mischung resultiert. Dies wird später besprochen werden.

Milchsäure kommt auch in kleinen Mengen vor als das Produkt von alkoholischer Gärung mit Hefe[2]) und intramolekularer Atmung[3]) von grünen Pflanzen unter aseptischen Kautelen bei Luftabschluß. Die dadurch erhaltene Menge ist jedoch geringfügig. Bakterielle Gärung ist notwendigerweise die eigentliche Ursache für die große Menge von Milchsäure, welche in eingesäuertem Mais vorkommt.

Optische Formen der Milchsäure.

Da die Gärungsmilchsäure ein asymmetrisches Kohlenstoffatom enthält, sind zwei optische Enantiomorphen möglich, eine rechts- und eine linksdrehende Form sowohl, als auch eine optisch inaktive oder razemische Mischung der beiden. Die rechtsdrehende Säure ist diejenige, welche ohne Ausnahme erhalten wird, wenn tierische Gewebe der Autolyse[4]) unterworfen werden. Gewöhnliche Milchsäuregärung von Kohlenhydraten wo keine Vorsichtsmaßregeln beobachtet werden, um Reinkulturen zu bewahren, gibt gewöhnlich die razemische Mischung. Andererseits sind viele Organismen bekannt, welche in Reinkultur eine einzige der optischen Formen produzieren; die Drehung ist in diesem Falle abhängig von den Organismen. In der Tat wird, nach McKenzie[5]), die razemische Mischung nie durch individuelle Arten produziert, sondern durch getrennte Arten, die die zwei entgegengesetzten Formen erzeugen, welche in gleichen Proportionen vorkommen können und in dieser Weise die inaktive Mischung bilden. Heinemann[6]) hält dafür, daß die Temperatur, bei welcher die Gärung stattfindet, die Aktivität der resultie-

---

[1]) Esten und Mason, Storrs. Agr. Exp. Stat. Bull., Nr. 70.

[2]) Mestrezat, Journ. Soc. Chem. Ind., Bd. 28, S. 734.

[3]) Stoklasa, Ernest und Chocensky, Zeitschr. physiol Chem., Bd. 50, S. 303.

[4]) Vergl. Saiki, Journ. Biol. Chem., Bd. 7, S. 17; Mochizuki und Arima, Zeitschr. physiol. Chem., Bd. 49, S. 109; Saito und Yoshikawa, Ebenda, Bd. 62, S. 107.

[5]) McKenzie, Journ. Chem. Soc., Bd. 87—88, S. 373.

[6]) Heinemann, Journ. Biol. Chem., Bd. 2, S. 603.

renden Säure einigermaßen bestimmt. Neuere Untersuchungen von Currie[1]) haben jedoch gezeigt, daß Reinkulturen in einzelnen Fällen inaktive Milchsäure produzieren können.

Versuche.

Unsere Versuche wurden mit der Absicht angestellt, den Milchsäuregehalt in typischen Proben von eingesäuertem Mais zu bestimmen, auch die optischen Formen, in welchen diese Säure vorkommt, und fernerhin festzustellen, ob die Art des Silo irgend welchen Einfluß auf die Menge und Beschaffenheit der Milchsäure ausübt.

Die Rückstände von unseren früheren Versuchen mit den flüchtigen Fettsäuren erwiesen sich als ein ausgezeichnetes Material für eine solche Untersuchung. Diese Proben wurden zu verschiedenen Zeiten und von verschiedenen Lagen aus drei verschiedenartigen Silos genommen. Die Silos sind aus Holz, hohlen Tonziegeln (hollow clay tile) und Backsteinen konstruiert, und sind in unserer früheren Mitteilung[2]) beschrieben. Die von den flüchtigen Säuren durch Dampfdestillation befreiten Rückstände wurden auf ein kleines Volumen eingedampft, mit Schwefelsäure versetzt und mit Äther zweiundsiebzig Stunden lang in einem Bremerschen Apparat extrahiert. Nach Entfernung des Äthers wurde der Auszug mit Wasser verdünnt und mit einem Überschusse von Baryumhydrat gekocht, dann auf bekannte Weise mit Schwefelsäure neutralisiert. Das Baryumsulfat wurde abfiltriert, und das Filtrat mit Zinksulfat in der gerade genügenden Menge behandelt. Die Lösung wurde wieder vom Baryumsulfat befreit und zu einem kleinen Volumen auf dem Wasserbad eingedampft. Sobald sich die Kristalle von milchsaurem Zink zu bilden anfingen, wurde die Lösung in einen Brutschrank bei 45° gestellt. Die Kristalle wurden durch einen Goochschen Tiegel filtriert, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und bei 100° getrocknet. Das gesamte Spülwasser und die Mutterlauge wurden einer zweiten und dritten Kristallisation unterworfen und die Kristalle wie zuvor behandelt. Die Gewichte der drei Kristallernten wurden sodann zueinander gefügt und die Summe als die gesamte Ausbeute von wasserfreiem Zinklaktat aus der Probe angesehen.

Tabelle 1 gibt die Daten in Beziehung auf die fünf Proben, welche aus jedem der drei Silos genommen wurden. In Tabelle 2 sind die

---

[1]) Currie, Journ. Biol. Chem., Bd. 10, S. 201. Die ziemlich ausführliche Literatur ist hier besprochen.

[2]) A. a. O.

Zahlen für das milchsaure Zink in freie Milchsäure umgerechnet, entsprechend 100 g trockenem eingesäuerten Mais. Für Vergleichszwecke ist auch die flüchtige Säure in dieser Tabelle und deren Verhältnis zu der flüchtigen Säure für jeden Silo angegeben worden.

Jede der nach obiger Beschreibung erhaltenen Proben des Zinklaktats wurde auf ihre optische Aktivität untersucht. In jedem Falle gab eine 1 % Lösung in einer 2 dcm-Röhre mit dem Polarisationsapparat eine Ablesung von Null. Unser Apparat konnte bis zum zwanzigsten Teil eines Grades der Ventzske-Skala abgelesen werden, und da die spezifische Drehung des aktiven Zinklaktats $\pm$ 7,5° ist, so muß der Fehler weniger als 10 % gewesen sein. Anders gesagt, das untersuchte milchsaure Zink muß mindestens zu 90 % inaktiv gewesen sein. Die Proben von Zinklaktat in den Tabellen 3 und 4 wurden in 4 %iger Lösung untersucht und gaben doch noch eine Ablesung von Null, daher müssen sie mindestens 97,5 % inaktives Salz enthalten haben.

Tabelle 1.

Probe-Nr.	Datum	Tiefe von der Oberfläche m	Wasser %	Flüchtige Säuren in 100 g Saft ccm decinormal	Wasserfreies Zinklaktat aus 100 g Saft g
		Holzsilo.			
1	8. 1. 12	0,610	65,44	149	1,197
2	5. 2. 12	2,440	71,68	192	1,949
3	4. 3. 12	4,270	67,28	174,2	2,005
4	1. 4. 12	5,490	69,32	281	1,633
5	29. 4. 12	7,320	70,28	208,8	2,305
		Backsteinsilo.			
1	17. 11. 11	0,610	69,56	122	0,581
2	1. 12. 11	2,440	62,96	113	2,289
3	15. 12. 11	3,660	68,72	128	2,335
4	29. 12. 11	5,490	71,56	145	2,161
5	12. 1. 12	6,710	78,72	241,5	0,779
		Hohlziegelsilo (Hollow clay tile silo).			
1	14. 11. 11	0,610	59,6	138,6	1,964
2	12. 12. 11	2,440	59,8	158	1,048
3	9. 1. 12	4,270	56,6	134	1,331
4	6. 2. 12	5,490	59,36	133,5	2,220
5	5. 3. 12	6,710	59,32	126,2	1,839

Tabelle 2.

Probe-Nr.	Zinklaktat aus 100 g Saft g	Milchsäure in 100 g trockenem Sauermais g	Flüchtige Säuren in 100 g trockenem Sauermais g
		Holzsilo.	
1	1,197	1,68	1,73
2	1,949	3,65	2,53
3	2,005	3,05	1,94
4	1,633	2,73	3,49
5	2,305	4,03	2,60
Durchschnittliches Verhältnis von Milchsäure zu den flüchtigen Säuren 1,0 zu 0,81.			
		Backsteinsilo.	
1	0,581	0,98	1,63
2	2,289	2,88	1,17
3	2,335	3,79	1,52
4	2,161	4,02	2,02
5	0,779	2,13	5,11
Durchschnittliches Verhältnis von Milchsäure zu den flüchtigen Säuren 1,0 zu 0,83.			
		Hohlziegelsilo.	
1	1,964	2,15	1,17
2	1,048	1,15	1,35
3	1,331	1,28	0,96
4	2,220	2,40	0,96
5	1,839	1,98	0,98
Durchschnittliches Verhältnis von Milchsäure zu den flüchtigen Säuren 1,0 zu 0,61.			

Durchschnittliches Verhältnis von Milchsäure zu den flüchtigen Säuren aller Proben 1,0 zu 0,75.

Eine aus den verschiedenen Exemplaren des Zinklaktates von den Bestimmungen in den Tabellen 1 und 2 zusammengesetzte Probe wurde umkristallisiert und das enthaltene Kristallwasser festgestellt.

2 g Kristalle gaben 0,3622 g Wasser.

Berechnet für Zinklaktat:

	Aktiv	Inaktiv	gefunden
Wasser	12,89	18,18	18,11

Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß das Zinksalz aus eingesäuertem Mais inaktiv war, es wäre denn, daß die Aktivität der verschiedenen Proben in entgegengesetzten Richtungen im gleichen Verhältnis war, was natürlich höchst unwahrscheinlich ist. Wir fühlen uns berechtigt, die Behauptung aufzustellen, daß die Proben des untersuchten milchsauren Zinks alle inaktiv waren.

Die gebildeten Milchsäuremengen.

Da nun die Menge und die optische Form der Milchsäure bekannt war, welche in diesen Proben von Sauermais vorkommt, blieb uns nur noch übrig, den Gang der Bildung zu studieren. Zu diesem Zwecke wurden Versuche mit zwei Silos, dem hölzernen und dem Hohlziegelsilo, für noch eine Saison geplant. Es war aber nötig Proben in häufigen Zwischenräumen zu nehmen, während die Gärung vor sich ging. Esten und Mason[1]) haben gezeigt, daß die Gärung nach der Füllung des Silos sehr schnell eintritt, und daß die Veränderungen praktisch vollständig sind nach Verlauf von zwei Wochen. Wir beschlossen daher täglich eine Probe zu untersuchen, bis die Gärung zum Stillstand gekommen wäre.

Bei dem Probenehmen lag die Schwierigkeit darin, genug Material zu erhalten, um eine genügende Probe in jedem Falle der Untersuchung zuzuführen und um zu gleicher Zeit Luftzutritt und die nachfolgende aërobe Gärung des angrenzenden Sauermaises zu verhüten. Vorversuche überzeugten uns, daß es zweckmäßig sei, Proben vermittels eines Erdbohrers durch ein 5 cm Loch in der Silotür zu erhalten. Sofort nach der Probeentnahme wurde das Loch durch einen hölzernen Pflock geschlossen. Die in dieser Weise erhaltenen Proben repräsentieren Material von der äußersten Schicht bis zur Mitte des Silos. Diese wurden alle in einer Tiefe von 2,4 bis 3,6 Meter oberhalb des Bodens genommen.

Da die Analysen nicht täglich ausgeführt werden konnten, so war es notwendig die Proben aufzubewahren, bis alle gesammelt waren. Um nun parallele Bestimmungen der flüchtigen Säuren zu machen, mußten diese Proben vor Verdunstung geschützt werden. Sterilisation in einem offenen Gefäß war daher nicht ausführbar und der Gebrauch von antiseptischen Stoffen war aus anderen Gründen nicht ratsam. Es wurde schließlich auf folgende Weise verfahren: Die sofort mit Hilfe der Buchnerschen Presse erhaltenen Saftproben wurden in Druckflaschen gebracht und in einem Autoklav sterilisiert, sodann beiseite gestellt, bis eine genügende Anzahl gesammelt war. In der Analyse wurden die flüchtigen Säuren unter vermindertem Druck beseitigt und der Rückstand wie in unseren vorhergegangenen Bestimmungen behandelt. Sterilisation und Destillation verwandelte keine aktive Milchsäure, die möglicherweise vorhanden war, in razemische Mischung, wie wir später beweisen werden.

---

[1]) Esten und Mason, a. a. O.

Tabelle 3. Der Holzsilo.

Probe-Nr.	Datum	Wasser-gehalt	Zinklaktat aus 100 g Saft	Milchsäure 100 g trockenem Sauermais entsprechend	Flüchtige Säuren 100 g trockenem Sauermais entsprechend
1	23. 9. 12	76,3	—	—	—
2	24. 9. 12	73,0	—	—	—
3	25. 9. 12	67,6	1,023	1,58	0,923
4	26. 9. 12	65,1	1,181	1,64	1,031
5	27. 9. 12	66,0	0,866	1,24	1,080
6	28. 9. 12	64,7	0,874	1,20	1,061
7	29. 9. 12	66,5	1,041	1,53	1,205
8	30. 9. 12	67,6	1,362	2,10	1,445
9	1. 10. 12	67,5	0,768	1,18	1,327
10	2. 10. 12	65,3	1,659	2,31	1,507
11	3. 10. 12	68,3	1,333	2,12	1,232
12	4. 10. 12	67,2	1,355	2,05	1,289
13	10. 10. 12	65,6	2,187	3,08	1,240
14	16. 10. 12	65,2	2,026	2,81	1,248

Tabelle 4. Der Hohlziegelsilo.

Probe-Nr.	Datum	Wasser-gehalt	Zinklaktat aus 100 g Saft	Milchsäure 100 g trockenem Sauermais entsprechend	Flüchtige Säuren 100 g trockenem Sauermais entsprechend
1	27. 9. 12	64,3	0,223	0,30	0,056 [1])
2	28. 9. 12	62,0	0,388	0,47	0,176 [1])
3	29. 9. 12	65,5	0,303	0,43	0,223 [1])
4	30. 9. 12	64,0	0,463	0,61	0,285
5	1. 10. 12	57,9	0,391	0,40	0,410 [1])
6	2. 10. 12	63,1	0,736	0,93	0,648
7	3. 10. 12	61,2	0,769	0,90	0,595
8	4. 10. 12	58,8	1,081	1,14	0,634
9	5. 10. 12	60,9	0,873	1,01	0,719 [1])
10	7. 10. 12	63,4	1,245	1,60	0,767 [1])
11	9. 10. 12	63,2	1,498	1,90	0,913 [1])
12	16. 10. 12	58,5	1,812	1,89	0,786

[1]) Als Essigsäure berechnet.

Der Holzsilo.

Die Füllung des Silos wurde am Morgen des 23. September begonnen. Die Körner des Maises waren ziemlich gekerbt, und die Maisstiele ein wenig grün in ihrem Aussehen. Die erste Probe repräsentiert Saft, welcher aus dem frischen Mais gepreßt war, wie derselbe von der Schneidemaschine kam. Titriert mit dezinormalem Baryumhydrat, waren 1,6 ccm Alkali nötig, um 10 ccm des Saftes zu neutralisieren. Die Säuremenge war so gering, daß kein Versuch gemacht wurde, die flüchtige und Milchsäure separat zu bestimmen. Die zweite Probe wurde ungefähr 12 Stunden später genommen. 10 ccm des Saftes erforderten 5,6 ccm Alkali zur Neutralisation. Separate Bestimmungen wurden auch aus den früher erwähnten Gründen unterlassen. Die analytischen Bestimmungen begannen mit der dritten Probe, welche 36 Stunden nach der Füllung des Silo genommen wurde. Es wurden nun täglich Probeentnahmen ausgeführt, bis die gesamte Azidität praktisch ein Maximum erreicht hatte.

Der Hohlziegelsilo.

Dieser Silo wurde am 27. September gefüllt. Der Mais war einigermaßen näher der Reife, als im Falle des hölzernen Silos. Eine beträchtliche Menge dieses Maises war zwei oder drei Tage vor der Einsäuerung geschnitten worden. Dies ist wahrscheinlich die Ursache für den niedrigeren beobachteten Wassergehalt. Die erste Probe repräsentiert daher nicht die frische Pflanze, sondern vielmehr das Material beim Beginne der Einsäuerung. In den ersten drei Proben stellt die flüchtige Säure einfach die Azidität des Vierliterdestillats dar, welche als Essigsäure berechnet wurde. Die Bildung der totalen Säure hatte praktisch am zwölften Tage ein Gleichgewicht erreicht; daher wurden keine weiteren Proben genommen.

Aus den auf den hölzernen Silo bezugnehmenden Zahlen ist es ersichtlich, daß die Menge der gebildeten flüchtigen Säure während der ersten drei Tage am größten ist. Bis zum dritten Tage ist fast zweimal so viel Säure gebildet worden als wie später vom drittten bis zum vierzehnten Tag. Die Bildung von flüchtigen Säuren erreichte praktisch ein Maximum zur Zeit, wo bloß die Hälfte der Milchsäure gebildet worden war.

Der Hohlziegelsilo zeigte eine viel langsamere Säurebildung sowohl der flüchtigen als auch der Milchsäure. Die Resultate sind nicht vergleichbar mit jenen des Holzsilos, weil die Maishalme zur Zeit des Einschneidens in einem höheren Grad der Reife waren, und die durch-

schnittliche Feuchtigkeit 4 % geringer war. Wegen der größeren Reife waren die löslichen Kohlenhydrate, welche fähig sind durch Gärung zu säuern, ohne Zweifel in kleinerem Maße vorhanden, und die Bedingungen für schnelle Gärung waren auch weniger günstig wegen des geringeren Wassergehaltes. In diesem Silo zeigten die Bestimmungen größere Gleichmäßigkeit als wie dies im anderen Silo der Fall war.

Es muß aber bedacht werden, daß der Inhalt eines Silos durchaus nicht gleichartig ist. Eine Anzahl von beitragenden Faktoren bewirken, daß eine gegebene Probe eingesäuerten Maises einigermaßen verschieden ist in der Zusammensetzung von dem angrenzenden Mais. Um zahlreiche Unregelmäßigkeiten auszuschließen wäre es notwendig, viel größere Proben zu nehmen, als man ohne Schädigung des übrigen Sauermaises für die Verfütterung entfernen und in einem chemischen Laboratorium bequem behandeln könnte. Die Resultate hingegen zeigen sehr deutlich die allgemeine Richtung, welche die Kurve einschlagen würde. Es ist ganz unwahrscheinlich, daß die Materialien, von welchen die beiden Silos konstruiert waren, irgend welchen Einfluß auf die Säuremengen der Gärung in den beiden Fällen hatten.

Verfaulter Sauermais.

Um den Einfluß von aërobischer Gärung auf die Milchsäure zu bestimmen, wurde eine Probe von verdorbenem eingesäuertem Mais von der Oberfläche des Holzsilos untersucht. Die Ergebnisse betreffs der flüchtigen Säure für diese Probe wurden in unserer früheren Mitteilung bekanntgegeben. Nach dem Abdampfen wurde der Rückstand mit Äther extrahiert und mit Zinkkarbonat in der gewöhnlichen Weise behandelt. Es wurden jedoch keine Kristalle von Zinklaktat erhalten. Beim Faulen des eingesäuerten Maises durch Schimmelpilze erleidet augenscheinlich die Milchsäure dasselbe Schicksal wie die flüchtigen Säuren. Diese Säuren sind nicht bloß neutralisiert durch basische Produkte, welche bei der Zersetzung des Proteins entstehen, sondern sie werden in der Tat zerstört.

Optische Formen der Milchsäure.

Die soweit erhaltenen Resultate zeigen an, daß die Milchsäure in eingesäuertem Mais optisch inaktiv ist. Dies ist zu erwarten, da die Milchsäure-Bakterien kaum in Reinkulturen vorhanden sein können, weil die Infektion nur zufällig ist. Gegen unsere Schlußfolgerung könnte hin-

gegen der Einwand gemacht werden, daß während der Behandlung der Probe eine razemische Umwandlung hätte stattfinden können. Dampfdestillation in der Gegenwart von flüchtiger und einem kleinen Überschuß von Mineralsäure und besonders Sterilisation des Sauermaissaftes im Autoklav könnte zu erwarten geben, daß eine molekulare Umwandlung verursacht würde, wodurch die beständigere inaktive Säure entstehe aus der aktiven Säure, die ursprünglich vorhanden war. In der Literatur war nichts angegeben bezüglich der Temperatur, bei welcher die Razemisation von Milchsäure beginnt. Um sicher festzustellen, ob eine solche Änderung in unseren Proben entstanden war, war es nötig, die zwei aktiven Formen darzustellen, und sie der gleichen Behandlung zu unterwerfen, um zu bestimmen, ob sie ihre Aktivität beibehielten.

Für die Trennung razemischer Säuren in ihre aktiven Komponenten sind verschiedene Methoden bekannt, wie zum Beispiel die spezifische Wirkung von Mikroorganismen, der Unterschied in der Löslichkeit und die verschiedene Art der Kristallisation der Salze mit optisch aktiven Basen wie den Alkaloiden. Eine bequemere Methode im Falle der Milchsäure ist die Gärung von Kohlenhydraten durch Reinkulturen von Organismen, welche bekanntlich die Fähigkeiten besitzen, die gewünschte optische Form hervorzubringen. Diese Methode wurde erfolgreich in unseren eigenen Versuchen angewendet.

Die Nährlösung, die zu diesem Zwecke diente, war folgendermaßen zusammengesetzt:

Destilliertes Wasser	1000 g
Milchzucker . . .	40 g
Pepton	10 g
Fleischextrakt . .	3 g
Natriumchlorid . .	5 g
Kalziumkarbonat .	16 g

Drei Liter der obigen Mischung wurden in separaten Kolben hergestellt und genug Glasperlen hinzugefügt, um den Boden des Kolbens zu bedecken. Nach Sterilisation wurde geimpft mit einer Reinkultur von Streptococcus lacticus. Die Kolben wurden in einem Brutschrank bei 35° aufbewahrt und täglich gründlich geschüttelt, wobei die Perlen das Kalziumkarbonat vom Boden des Kolbens, wo es sich gesetzt hatte, aufrührten und dadurch eine vollständigere Neutralisation der gebildeten Säure sicherten. Nach vier Wochen wurden die Kulturen filtriert und zu einem kleinen Volumen abgedampft. Schwefelsäure wurde hinzugefügt, um die Milchsäure von ihrem Kalksalz zu befreien und das

gefällte Kalziumsulfat wurde sodann durch die Zentrifuge entfernt. Die Lösung wurde mit Äther drei Tage lang extrahiert. Der Auszug wurde mit Wasser verdünnt, und der Äther durch Abdampfung entfernt. Diese wässerige Lösung wurde nun mit Zinkkarbonat behandelt und bis zu beginnender Kristallisation eingedampft, dann beiseite gestellt, bis ein reichlicher Kristallanschuß erhalten war. Die spezifische Drehung dieses Zinksalzes stimmte mit der des Zink-d-laktats überein.



Fig. 1.
Zink-l-laktat aus Kulturen von Bacterium aerogenes.

[α] D 1% Lösung gefunden — 7,8°
[α] D 4% „ Theorie[1]) — 7,55°

Das rechtsdrehende Zinksalz der Säure wurde auf dieselbe Weise dargestellt, mit der Ausnahme, daß die Impfung mit Bacterium aërogenes geschah, anstatt mit Streptococcus lacticus, und daß die Kulturen nur zwei Wochen im Brutschrank blieben. Der Auszug zeigte eine Linksdrehung vor und eine Rechtsdrehung nach der Neutralisation

[1]) Hoppe-Seyler und Araki: Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 20, S. 371.

mit Zinkkarbonat. Gut gebildete Kristalle wurden ohne Schwierigkeit erhalten.

$[\alpha]$ D 1% Lösung gefunden $+ 7,75^0$
$[\alpha]$ D 4% „ Theorie[1]) $+ 7,55^0$

Nach der Erhaltung der optischen Formen der Milchsäure blieb es uns übrig, eine Lösung von bekannter Aktivität derselben Behandlung zu unterwerfen, welche den Sauermaisproben zuteil wurde, d. h. Sterilisation im Autoklav in Gegenwart von flüchtiger Säure und Verdampfung unter vermindertem Druck. Eine Lösung, welche flüchtige und nichtflüchtige Säure in ungefähr gleichen Verhältnissen und gleicher Konzentration enthielt, wie sie im Sauermaissaft vorkommen, wurde folgender Weise zubereitet. Zu 100 ccm einer Lösung der d-Säure, welche eine Drehung von $+ 0,6^0$ V. in einer 4 dcm-Röhre aufwies, wurden 100 ccm von 1% Essigsäure hinzugefügt. Nach Sterilisation auf gewöhnliche Weise in einer Druckflasche wurden 10 ccm dezi-



Fig. 2.
Zink-dl-laktat aus eingesäuertem Mais.

[1]) Hoppe-Seyler und Araki: Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 20, S. 371.

normaler Schwefelsäure hinzugefügt, und die Lösung mit Dampf unter vermindertem Druck destilliert, bis ein Destillat von 4 Liter übergegangen war. Der die Milchsäure enthaltende Rückstand wurde zu seinem ursprünglichen Volumen (100 ccm) verdampft und in einer 4 dcm-Röhre untersucht.



Fig. 3.
Zink-d-laktat aus Kulturen von Streptococcus lacticus.

	Polarisation
Ursprüngliche Lösung	+ 0,6° V.
Nach Ster. und Dest.	+ 0,6° V.

Eine ähnliche Behandlung mit l-Säure ergab folgende Resultate:

	Polarisation
Ursprüngliche Lösung	— 0,4° V.
Nach Ster. und Dest.	— 0,4° V.

Diese Versuche zeigen entscheidend, daß die aktiven Isomeren der Milchsäure nicht razemisiert werden durch die Behandlung, welcher unsere Sauermaisproben vor und während der Analyse unterworfen wurden.

Nebenbei zeigen die isomeren Formen des Zinklaktats einige interessante kristallographische Betrachtungen. Die inaktive Modifikation

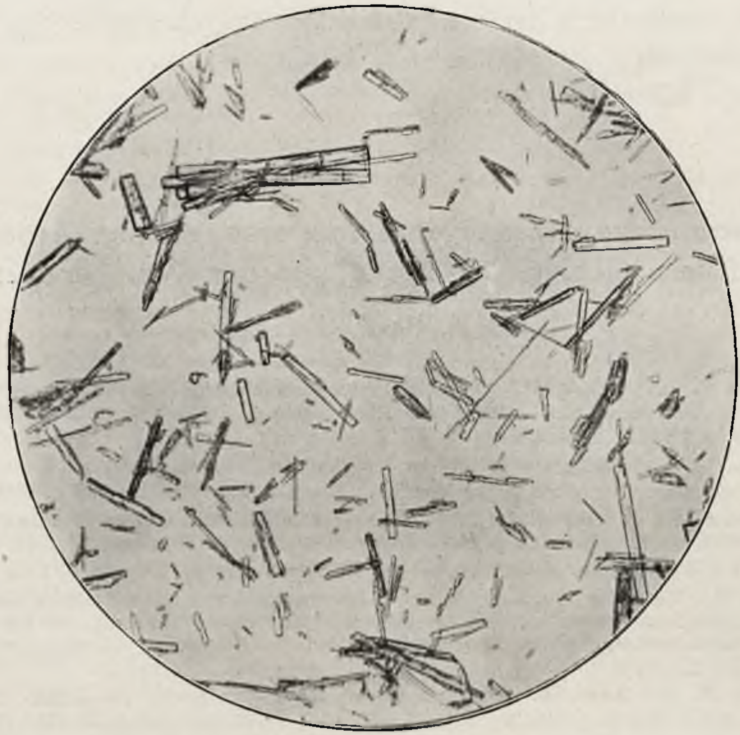


Fig. 4.
Zink-dl-laktat aus Handelsmilchsäure.

mit drei Molekülen Kristallwasser ist besonders verschieden in Kristallform von den aktiven Arten mit zwei Molekülen Wasser. Die Photomikrographien (Fig. 1—4) veranschaulichen diese Unterschiede. Das Zinksalz aus eingesäuertem Mais und das aus Handels-dl-Milchsäure zeigen dieselbe Kristallform. Die aktiven Salze hingegen sind ganz eigenartig, aber unterscheiden sich voneinander nur in der räumlichen Anordnung der Kristallflächen und sind deshalb Enantiomorphen.

Schlußbetrachtungen.

1. Milchsäure ist normalerweise in eingesäuertem Mais im Überschuß gegenüber der flüchtigen Säure vorhanden. Das durchschnittliche Verhältnis war 1,0 zu 0,76.

2. Die Form, in welcher die Milchsäure in eingesäuertem Mais vorkommt, ist die inaktive oder razemische Mischung.

3. Die Menge der Milchsäure und ihr Verhältnis zu den flüchtigen Säuren werden nicht durch die Materialien, aus welchen der Silo erbaut ist, beeinflußt.

Literaturliste der im Jahre 1912 erschienenen Arbeiten auf dem Gebiete der Mykologie der Weinbereitung.

Von **H. Harff**, Weinsberg.

Amthor, C. und **Kraus, P.** Weinstatistische und moststatistische Untersuchungen für Unterelsaß und Lothringen. Ergebnisse d. amtl. Weinstatistik, Berichtsjahr 1910/11, S. 202, 570.

Astruc, H. Expérience de vinification. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 971.

— Les nouveaux procédés de vinification. Ebenda, **38**, 1912, Nr. 989 u. 990.

Baragiola, W. J. und **Godet, Ch.** Weine aus überschwefelten Traubenmosten. Mitt. a. d. Gebiete d. Lebensmitteluntersuchung u. Hygiene, **3**, 1912, Heft 3.

— — Die Wertung der Milchsäure bei der Weinbeurteilung. Ebenda, **3**, 1912, Heft 5.

Bauer, E. Versuche zur analytischen Bestimmung freier Schwefelsäure neben organischen Säuren und deren gärungsphysiologische Wirkung mit besonderer Berücksichtigung der Brennereimaischen. Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. II, 1912, S. 66.

Becker, S. und **Loos, A.** Die Zusammensetzung der Moste des Jahres 1911 im Großherzogtum Baden. Mitt. d. Deutsch. Weinbau-Vereins, **7**, 1912, Nr. 7.

Bouko, A. Die Einwirkung reinen Stickstoffs auf verschiedene Weingattungen. Allg. Weinztg., 1912, Nr. 1482.

Bokorny, Th. Einwirkung von Metallsalzen auf Hefe und andere Pilze. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **35**, 1912, Nr. 6—10.

Brunet, R. La préparation du moût. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 974.

— La température du moût. Ebenda, **38**, 1912, Nr. 973.

— Le cuvage des moûts rouges. Ebenda, **38**, 1912, Nr. 977, 979.

— Le soutirage. Ebenda, **38**, 1912, Nr. 988.

Buchner und **Meisenheimer.** Die chemischen Vorgänge bei der alkoholischen Gärung. 5. Mitteilg. Ber. d. deutschen chem. Gesellsch., Bd. 45, 1912, S. 1633.

Carles, P. La consommation de l'acide tartrique. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 971.

Demolon, A. et **Kayser, E.** Influence de quelques facteurs et notamment des sels de chaux sur le vieillissement des vins en présence de levure. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 970.

Dubourg, E. et **Gayon, U.** Recherches sur la vitalité des levures. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 968.

Ewert, R. Verschiedene Überwinterung der Monilien des Kern- und Steinobstes und ihre biologische Bedeutung. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh., **22**, 1912, S. 65.

Fallot, B. La fermentation alcoolique. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 974.

Fischer. Zur Behandlung der zum Braunwerden neigenden 1911er Weißweine. Geisenheimer Mitt., 1912, Nr. 1.

— Entsäuerung mittels reinen gefällten kohlensauren Kalk. Ebenda, 1912, Nr. 9.

— Winzer sorgt für eine gute Vergärung der 1912er. Ebenda, 1912, Nr. 11.

Gayon, U. et **Dubourg, E.** Recherches sur la vitalité des levures. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 968.

Graff, G. Alkoholgehalt der Süßweine. Deutsche Wein-Ztg., Jahrg. 49, 1912, Nr. 40.

— Zur Behandlung von Samoswein. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel, **23**, 1912, Nr. 9.

Guilliermond, A. Les Levures. Paris 1912.

Günther, A. Die Entsäuerung des Weines mit kohlensaurem Kalk. Mitt. d. D. Weinbau-Vereins, 7, 1912, Nr. 11.

Haid, R. Über den unvergärbaren Zucker (Pentose) und die Furfurolbildung im Wein. Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. II, 1912, S. 107.

Halenke und **Krug.** Vergleichende Versuche über den Säurerückgang in gezuckerten und ungezuckerten Weinen des Jahres 1910 aus dem Weinbaugebiet der Pfalz. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 15 u. 16.

— Weinstatistische und moststatistische Untersuchungen für Bayern. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berichtsjahr 1910/11, S. 126, 422.

Heide, C. v. d. Der Einfluß des Schönens auf die chemische Zusammensetzung des Weines. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel, **24**, 1912, Nr. 4.

— Untersuchung von Mosten des Jahres 1911 aus den preußischen Weinbaugebieten. Ebenda, **23**, 1912, Nr. 10.

— Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen, Preußen. A. Rheingau usw. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 35, 218.

Kayser, E. Recherches sur la Graisse des Cidres. La Revue de Cidre et Le Poire, Paris, 1912.

— et **Demolon, A.** Influence des quelques facteurs et notamment des sels de chaux sur le vieillissement des vins en présence de levure. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 970.

Kita, G. Hefen aus Ikashiokara. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **35**, 1912, Nr. 17—19.

Konoktin und **Nadson.** Guilliermondia, eine neue Hefegattung mit heterogener Kopulation. Orig.-Ref. im Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **34**, 1912, Nr. 10—13.

Kossowicz, Al. Die Bindung des elementaren Stickstoffs durch Saccharomyceten (Hefen), Monilia candida und Oidium lactis. Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. I, 1912, S. 253.

— und **Loew, W.** Über das Verhalten von Hefen und Schimmelpilzen zu Natriumthiosulfat. Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. II, 1912, S. 87.

Krauß, P. und **Amthor, C.** Weinstatistische und moststatistische Untersuchungen für Unterelsaß und Lothringen. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berichtsjahr 1910/11, S. 202, 570.

Krömer, K. Die Bildung flüchtiger Säuren durch die Organismen des Weines. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 10—11.

— Über Maskenbildung im Schaumwein. Neue D. Weinztg., Jahrg. 7, 1912, Nr. 6.

Krug und **Halenke.** Vergleichende Versuche über den Säurerückgang in gezuckerten und ungezuckerten Weinen des Jahrgangs 1910 aus dem Weinbaugebiet der Pfalz. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 15—16.

Krug und **Halenke.** Weinstatistische und moststatistische Untersuchungen für Bayern. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berichtsjahr 1910/11, S. 126, 422.

Krug und **Schätzlein.** Untersuchung der 1912er Moste der Pfalz. Mitt. d. D. Weinbau-Vereins, **7**, 1912, Nr. 12.

Kulisch, P. Die 1912er Weine Elsaß-Lothringens und deren Behandlung. Landw. Zeitschr. f. Elsaß-Lothringen, **40**, 1912, Nr. 46.

— Einige Winke betr. die Kellerbehandlung der Weine des Jahrgangs 1911. Ebenda, **40**, 1912, Nr. 2.

— Gärungsverzögerungen an den 1912er Mosten. Ebenda, **40**, 1912, Nr. 43.

— Vortragskursus über die Erziehung der elsässischen Weine zur Flaschenreife. Ebenda, **40**, 1912, Nr. 32.

— Winke für die Behandlung der geringsten der 1912er Weine, namentlich solcher von stark erfrorenen Trauben. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 44.

— Weinstatistische und moststatistische Untersuchungen für Elsaß-Lothringen. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 154, 550.

Lendrich, Kikton, Murdfield. Die Auslandwein-Kontrolle in Hamburg bis zum 31. Dezember 1911. Zeitschr. f. Unters. d. Nahrungs- u. Genußmittel, **24**, 1912, Nr. 12.

Lerou, J. L'ouillage des vins. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 985.

— La fabrication des piquettes. Ebenda, **38**, 1912, Nr. 983.

Lindner, P. Über das allgemeinere Vorkommen von Hefe und Alkohol in der Natur. Ein Beitrag zur Naturgeschichte der alkoholischen Gärung. Tagesztg. f. Brauerei, 1912, Nr. 88.

Loos, A. und **Becker, S.** Die Zusammensetzung der Moste des Jahrgangs 1911 im Großherzogtum Baden. Mitt. d. Deutsch. Weinbau-Vereins, **7**, 1912, Nr. 7.

Mach, F. und **Stang, A.** Weinstatistische und moststatistische Untersuchungen für Baden. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsj. 1910/11, S. 140, 479.

Martinand, V. Des qualités que doivent présenter les levures et de leur emploi dans la vinification. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 974, 975.

Mathieu, L. Influence de la température de cuvaison sur la qualité du vin rouge. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 976.

Mayrhofer. Weinstatistische und moststatistische Untersuchungen für Rheinhessen. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 144, 499.

Meißner, R. Behandlung der 1912er Weine. Südd. Küferztg., Jahrg. 9, 1912, Nr. 20.

— Behandlung der 1912er württemb. Weine. Ebenda, Jahrg. 9, 1912, Nr. 21.

— Behandlung essigstichiger Mostfässer. Weinbau, **11**, 1912, Nr. 1.

— Behandlung säurereicher und säurearmer Weine unter besonderer Berücksichtigung des natürlichen Säureabbaues. Südd. Küferztg., Jahrg. 9, 1912, Nr. 14.

— Die Behandlung kranker und fehlerhafter Obstmoste. Neue Deutsch. Weinztg., Jahrg. 7, 1912, Nr. 10.

— Moststatistische Untersuchungen von 1912er württemb. Traubensäften. Weinbau 1912. Deutsche Küfer- u. Kellereiztg., 1912. Weinbau u. Weinhandel, 1912, Nr. 49.

— Untersuchung von 1911er württemb. Traubensäften. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berichtsjahr 1910/11, Berlin 1912, S. 459.

— Über die Aufbewahrung unvergorener Beeren-, Obst- und Traubensäfte im kleinen Haushalt. Württ. Landw. Wochenbl., 1912, Nr. 28.

— Über die langsame Gärung des Asti-Muskatweines (Asti spumante). Allg. Weinztg. Wien, 1912, Nr. 1503.

— Versuche über die Entsäuerung von 1910er württemb. Weinen mittels reinen gefällten kohlensauren Kalkes. Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, **1**, 1912, Heft 1.

— Versuche über die Vergärung von Traubensäften bei Gegenwart von Petroleum und die Wiederherstellung petroleumhaltiger Getränke. Weinbau, **11**, 1912, Nr. 1.

— Versuche über die Verwendung reingezüchteter württemb. Weinhefen in der Praxis der Schaumweinbereitung. Neue Deutsch. Weinztg., Jahrg. 7, 1912, Nr. 1.

— Vorsicht beim Verbessern der 1912er Traubensäfte und Weine. Württ. Landw. Wochenbl., 1912, S. 711.

Meißner, R. Weinstatistische Untersuchungen von 1910er württemb. Weinen. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berichtsjahr 1910/11, Berlin 1912, S. 134.

— Zehnjähriger Versuch über die Lebensdauer reingezüchteter Weinhefen in 10prozentiger Rohrzuckerlösung. Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, **1**, 1912, Heft 2.

Mensio, C. Der Asti-Muskatschaumwein (Asti spumante). Allg. Weinztg., Wien, 1912, Nr. 1486.

Merz, J. L. Die Verwertung fehlerhafter und kranker Weine. Allg. Weinztg., 1912, Nr. 1477.

— Ist eine Übertragung des Sortenbouketts mittels Reinhefe möglich? Ebenda, 1912, Nr. 1479.

Molz, E. Bemerkungen zu Munks Arbeit. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **34**, 1912, Nr. 1—3.

— Richtigstellung der Entgegnung Dr. M. Munks. Ebenda, **36**, 1912, Nr. 15—18.

Moreau, L. et **Vinet, E.** Etudes sur la vinification des raisins blancs de Chenin. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 963, 983.

Munk, M. Entgegnung auf Dr. E. Molz' Antwort. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **34**, 1912, Nr. 18—22.

Muth, Fr. Der 1912er Jahrgang. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 50 u. 51.

Müller-Thurgau, H. Bericht der Schweiz. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau in Wädenswil für die Jahre 1909 und 1910. Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1912, S. 269—468.

Müller-Thurgau und **Osterwalder, A.** Die Bakterien im Wein und Obstwein und die dadurch hervorgerufenen Veränderungen, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **36**, 1912, Nr. 6—14.

Neuberg, C. und **Kerb, J.** Entsteht bei zuckerfreien Hefegärungen Äthylalkohol? Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. I, 1912, S. 114.

Omeis, Th. Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen für Bayern. A. Franken. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 116, 395.

— Versuche bezüglich Entsäuern mit reinem gefällten kohlensauren Kalk. Ebenda, S. 604.

— Versuche und Untersuchungen zur Erforschung des Säurerückganges im Wein. Ebenda, S. 597.

Osterwalder, A. Eine neue Gärungsmonilia: Monilia vini n. sp. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **33**, 1912, Nr. 11—14.

— Über die Bildung flüchtiger Säuren durch die Hefen nach der Gärung bei Luftzutritt. Ebenda, **32**, 1912, Nr. 20—25,

— Verwendet die Reinhefe bei der Vergärung der Obstweine. Schweiz. Zeitschr. f. Obst- u. Weinbau, 1912, S. 277.

— Von der Obstfäule am Baum. Ebenda, 1912, S. 261.

— Ziehet die milden Obstweine nach der Gärung vom Trub ab. Ebenda, 1912. S. 7.

Petri, W. Mosel-, Rhein- und Ahr-Moste des Jahrgangs 1911. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel, **23**, 1912, Nr. 8.

— Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen für Preußen. Gebiet der Mosel usw. Ergebnisse d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 62, 276.

Roos, L. Vins rosés. Revue de Viticulture, **38**, 1912, Nr. 972.

Schätzlein, Ch. Zur Behandlung der 1912er Weine. Mitt. d. D. Weinbau-Vereins, **7**, 1912, Nr. 11.

Schätzlein und **Krug.** Untersuchung der 1912er Moste der Pfalz. Mitt. d. D. Weinbau-Vereins, **7**, 1912, Nr. 12.

Schellenberg. Zur Bereitung der Rotweine. Schweiz. Zeitschr. f. Obst- u. Weinbau, 1912, S. 293.

Schindler. Praktische Winke für die Behandlung säurereicher Jungweine. Allg. Weinztg., Wien, 1912, Nr. 1505.

Schneider-Orelli, O. Versuche über die Wachstumsbedingungen und Verbreitung der Fäulnispilze des Lagerobstes. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **32**, 1912, Nr. 6—12.

— Zur Kenntnis des mitteleuropäischen und des nordamerikanischen Gloeosporium fructigenum. Ebenda, **32**, 1912, Nr. 13—19.

Seifert, W. Klosterneuburger Versuche mit Kohlensäure behufs Verhinderung des Kahmigwerdens. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 37.

— Tätigkeitsbericht des chemischen Versuchs- und Hefereinzuchtlaboratoriums Klosterneuburg 1911/12.

Staug, A. und **Mach, F.** Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen für Baden. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 140, 479.

Stern. Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen für Preußen. B. Weinbaugebiet der Nahe, der Nahe und des Glans usw. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 52, 251.

Süß. Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen für das Königreich Sachsen. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 132, 457.

Wellenstein. Die Moste des Jahrganges 1911 aus dem Gebiete der Mosel und ihrer Nebenflüsse. Zeitschr. f. Unters. d. Nahr.- u. Genußmittel, **23**, 1912, Nr. 12.

— Versuche über Säureabbau. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 30.

— Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen für Preußen. D. Gebiet der Obermosel, Mittelmosel, Saar und Ruwer. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 38, 340.

Weller. Moststatistische und weinstatistische Untersuchungen für Hessen. B. Bergstraße und Odenwald. Ergebn. d. amtl. Weinstatistik, Berlin, Berichtsjahr 1910/11, S. 150, 541.

Wortmann. Über den Einfluß der Temperatur auf den Geruch und Geschmack des Weines. Weinbau u. Weinhandel, **30**, 1912, Nr. 2, 3, 4 u. 5.

Zschokke. Die Herstellung alkoholfreier Getränke mit Kohlensäure. Schweiz. Zeitschr. f. Obst- u. Weinbau, 1912, S. 290.

Referate.

Burri, R. (Ref.) und Kürsteiner, J. Zur Klärung der Anschauungen über die reduzierenden Eigenschaften der Kuhmilch. Milchwirtschaftl. Zentralbl., Bd. 41, 1912, S. 40, 68, 101, 134, 168.

Die von Seligmann u. a. beigebrachten Beweismittel zur Stütze einer einheitlichen Auffassung der in normaler, ungekochter, mit formalinfreiem oder formalinhaltigem Methylenblau gefärbten Milch zur Wirkung gelangenden Reduktionsfaktoren müssen eine Umdeutung erfahren. Die Verschiedenheit der in Betracht kommenden Reduktionskräfte ist schon durch die Arbeiten von Trommsdorff und Rullmann, Bredig und Sommer festgestellt und durch die vorliegenden Ergebnisse neuerdings bestätigt worden.

Bei der Erklärung der im Gebiet der reduzierenden Wirkung der Milch einwandfrei beobachteten Erscheinungen sind insbesondere folgende Resultate und Erwägungen in Berücksichtigung zu ziehen:

1. Bei den üblichen Reduktionsprüfungen kann nicht nur der über, sondern auch der in dem Reaktionsgemisch befindliche molekulare Sauerstoff den reinen Reduktionsvorgang hemmen, was namentlich in jenen Fällen von Bedeutung ist, wo es sich um den Nachweis von sehr geringen Mengen reduzierender Substanz handelt. Der exakte Reduktionsversuch muß demnach unter Bedingungen durchgeführt werden, die gestatten, die zu reduzierende Farbstofflösung einerseits und die das Reduktionsmittel enthaltende Flüssigkeit andererseits unabhängig voneinander sauerstofffrei zu machen und sodann auf einwandfreie, jedes Zutreten von Sauerstoff ausschließende Weise miteinander zu vereinigen. Diese Versuchsanordnung ist gegeben in dem bei Studien über Anaerobiose von J. Kürsteiner verwendeten, mit dem Wright-Burrischen Anaerobenverschluß versehenen, zweiteiligen Kulturrohr. Die unter Einhaltung der genannten Versuchsbedingungen gewonnenen Resultate bestätigen vollkommen die Berechtigung der Forderung des vollständigen Sauerstoffausschlusses zur Darstellung des reinen Reduktionsvorganges (M-Reaktion). Bei der Deutung der Befunde von Trommsdorff und Rullmann, wonach nachweislich keimfreie, rohe, aerob verschlossene Milch die M-Reaktion nicht gibt, wäre der wichtige Faktor des ungehinderten Sauerstoffzutrittes zu berücksichtigen. Es ist anzunehmen, daß es eine von Sauerstoff

befreite und vor Sauerstoffzutritt geschützte Milch, die Methylenblau nicht entfärbt, kaum geben kann, daß vielmehr jede Milch Bestandteile enthält, die auf Methylenblau reduzierend wirken, abgesehen von den Bakterien, die unter gewöhnlichen Umständen natürlich in erster Linie die Reduktion des Methylenblaus in Milch zu bewirken vermögen.

Die Rolle, die die Bakterien bei der M-Reaktion und bei Reduktionsvorgängen überhaupt spielen, ist in vorliegender Arbeit zum Gegenstand einer eingehenden Diskussion gemacht worden. Nach den Anschauungen Pflügers, P. Ehrlichs u. a. kann als feststehend gelten, daß das lebende Protoplasma Sauerstoff durch chemische Bindung aufnimmt und daß ein solches oxydiertes Plasma denselben wieder abgeben kann. Diese Tatsachen deuten auf die Möglichkeit hin, daß das Plasma seinen Sauerstoffbedarf unter Umständen überhaupt nicht aus dem freien Sauerstoff der Umgebung zu entnehmen braucht, sondern imstande ist, gebundenen Sauerstoff sich auf dem Wege der Reduktion zu eigen zu machen. Ein Beweis, daß dieser Weg, den man, im Gegensatz zur gewöhnlichen Sauerstoffaufnahme, als Sauerstoffschiebung bezeichnen könnte, vom Plasma benutzt wird, liegt in der Existenz der obligat nnd fakultativ anaeroben Bakterien, wie auch der intramolekularen Atmung aerober Organismen. Die Annahme, daß es kein lebendes Plasma ohne Reduktionsvermögen gibt, ist berechtigt und wo der Versuch das Gegenteil zu beweisen scheint, ist in Erwägung zu ziehen, daß das Reduktionsvermögen gewisser Zellen einen ausgesprochen elektiven Charakter hat und demnach nicht bei Verwendung eines beliebigen Indikators zum Ausdruck zu gelangen braucht und ferner, daß die reduzierende Fähigkeit bei geringer quantitativer Ausprägung der Beobachtung entgehen kann. Nach Cathcart und Hahn, welche Autoren sich im besonderen mit der Ergründung des Wesens der Bakterienreduktion befaßten, zeigten alle untersuchten Bakterienarten, wenn auch in verschiedenem Grade, das Vermögen, Methylenblau zu reduzieren. Im einzelnen Versuch war die Intensität der Reduktion abhängig von der Art und von der Zahl der in der Suspension enthaltenen Zellen wie auch von der Natur des Suspensionsmediums. Alle Einflüsse, welche das Bakterienleben zu schädigen geeignet sind, wirkten im allgemeinen hemmend oder völlig unterdrückend auf die Reduktion. Besonders bemerkenswert ist die Feststellung, daß anaerobe Bakterien gewöhnlich viel kräftiger reduzieren als aerobe und daß von den fakultativ anaeroben die bei Luftausschluß herangewachsenen Zellen bezüglich der Reduktionskraft den unter aeroben Verhältnissen gestandenen Zellen überlegen sind. Bei der Nachprüfung dieser Befunde wurde konstatiert, daß das fakultativ anaerobe Bact. coli unter gleichen Bedingungen in viel kürzerer Zeit (12—36 Min.) eine Methylenblaulösung entfärbte als die aeroben Mikroorganismen Mycoderma und Bac. megatherium (4 Stunden). Bei den letzteren ergab sich, daß die der Luft ausgesetzten Parallelkulturen später entfärbt waren als die vor Sauerstoffzutritt geschützten. Es ist nicht überraschend, wenn bei ausgeprägt sauerstoffbedürftigen Organismen die oxydativen Pro-

zesse bei Gegenwart molekularen Sauerstoffes überwiegen nnd allfällig vorhandene reduzierende Fähigkeiten der Zelle nicht hervortreten lassen, während gerade bei Sauerstoffmangel das Reduktionsvermögen das Mittel bildet, den Stoffwechsel und damit das Leben auf einige Zeit zu unterhalten. Hinsichtlich der Verhältnisse, wie sie für die in der Milch vorkommenden Bakterien bestehen, ist sicher, daß die Zeit, die bis zur Entfärbung einer mit Methylenblau gefärbten, rohen Milch verstreicht, um so kürzer sein wird, je mehr Milchsäurebakterien die Milch enthält, bezw. je älter sie ist. Aus diesem Zeitmaß einen Schluß auf den Keimgehalt bezw. Frischezustand der betreffenden Milch zu ziehen, ist auf Grund einschlägiger Arbeiten von P. Th. Müller, Orla-Jensen, der Verf. u. a. vollkommen gerechtfertigt.

Zu beachten sind bei der Durchführung von Reduktionsversuchen wissenschaftlicher und praktischer Art zwei noch sehr wenig aufgeklärte Fehlerquellen. Die eine derselben liegt im Methylenblau selbst, bezw. in der wenig stabilen Natur dieses Farbstoffes. Die andere Fehlerquelle ist in dem eigentümlichen Verhalten des Methylenblaus gegenüber dem Sonnenlicht begründet. Direktes Sonnenlicht ist imstande, gewisse im zerstreuten Licht vollständig entfärbte Milch-Methylenblaugemische, die unter dem Anaerobenverschluß gehalten werden, wieder blau zu färben. In der Dunkelheit geht die blaue Farbe wieder in Weiß über, kann jedoch durch erneute Sonnenbestrahlung wieder erzeugt werden u. s. f. Andererseits kann man beobachten, daß relativ stark verdünnte, wässerige Methylenblaulösungen im direkten Sonnenlicht nach kurzer Zeit zu verblassen beginnen und beinahe farblos werden.

Die eigentliche Natur des in Wirkung tretenden reduzierenden Prinzips bei der durch Bakterienwirkung bedingten Entfärbung einer beliebigen, mit Methylenblau versetzten Rohmilch ist noch nicht endgültig festgestellt. Einige Autoren sind geneigt, die Existenz reduzierender Enzyme bei den Bakterien anzunehmen (Bakterienreduktase), während andere die in der Milch auf Zusatz von bestimmten Farbstoffen eintretenden Reduktionserscheinungen als unmittelbare Wirkung des Bakterienplasmas auffassen. Die experimentellen Resultate von H. Smidt, E. Carapelle und Cathcart und Hahn sprechen eher gegen als für die Existenz eines von Bakterien gebildeten reduzierenden Enzyms. W. Kruse dagegen glaubt, daß schon der Augenschein in Stich- und Strichkulturen, die mit reduzierbaren Farbstoffen versetzt sind, die allmählich eintretende Diffusion des reduzierenden Stoffes beweist, die nur dadurch ermöglicht würde, daß die Zellen eben die wirksamen Stoffe ausscheiden. Diese Deutung des Bildes, welches mit reduzierbaren Farbstoffen versetzte Stich- und Strichkulturen zeigen, ist nach Ansicht der Verf. nicht richtig. Daß die Entfärbung nicht bloß auf die mit der Bakterienmasse in direkter Berührung stehenden Teile des Nährbodens beschränkt bleibt, sondern sich auf dessen keimfreie Partien in bedeutende Entfernung erstreckt, braucht nicht notwendigerweise mit einer Diffusion reduzierender Stoffe erklärt zu werden. Ebenso plausibel ist die Annahme, daß der im Nährboden an-

fänglich vorhandene Sauerstoff von der wachsenden Bakterienmasse sehr schnell und vollständig aufgezehrt wird, so daß in der Umgebung der eigentlichen Kultur eine sich beständig vergrößernde sauerstofffreie Zone entsteht. Damit sind aber die Bedingungen geschaffen, daß auch Spuren reduzierender Substanzen, die in künstlichen, bei der Sterilisation meist hocherhitzten Nährböden niemals fehlen, ihre Wirkung geltend machen, d. h. im vorliegenden Falle das Methylenblau in seine Leukoverbindung überführen können. Wenn es übrigens auch gelingen sollte, bei reduzierenden Bakterien die Ausscheidung von reduzierenden Stoffwechselprodukten nachzuweisen, so kann es sich nach allen vorliegenden Erfahrungen nur um geringe Mengen handeln, die für die Erklärung der mächtig wirkenden Reduktionskräfte in gewöhnlichen Kulturen solcher Bakterien nicht ausreichen und es bleibt dann immer noch die Frage, ob der dem Nachweis zugängliche, durch reduzierende Stoffwechselprodukte bewirkte Vorgang mit der von der direkten Beteiligung der lebenden Zelle abhängigen Hauptreduktion überhaupt in ursächlichem Zusammenhang steht.

Nach Ansicht der Verf. liegen zurzeit für die Existenz einer von den Bakterien ausgeschiedenen reduzierenden Substanz enzymartiger Natur keine Beweise vor. Die bekannte Reduktionserscheinung, im besonderen die Entfärbung einer mit Methylenblau von bestimmter Konzentration gefärbten Milch ist eine unmittelbar durch die Bakterienzelle bezw. durch gewisse Plasmabestandteile hervorgerufene Wirkung. Diese Auffassung nähert sich dem Standpunkt Heffters, welcher die Reduktionskraft der Zellen des tierischen Gewebes mit der reduzierenden Wirkung gewisser labiler Atomgruppen des Plasmas, im besonderen Sulfhydrylgruppen erklären will. Diese in gewissem Sinne grobchemische Auffassung will R. Burri dahin modifizieren, daß im Bakterienplasma labile, reduzierende Gruppen anzunehmen wären, deren Existenzmöglichkeit mit dem Leben des Plasmas mehr oder weniger eng verbunden ist. Mit dieser Annahme würde einerseits dem auffallenden Parallelismus zwischen Lebenstätigkeit der Zelle und Reduktionswirkung und andererseits einer bei gewissen Arten ausgeprägten Spezifität der Reduktionswirkung Rechnung getragen.

2. Beim Erhitzen der Milch entstehen reduzierende Stoffe, deren Wirkung unter Umständen die Anwesenheit anderer reduzierender Agentien vortäuschen kann. Die Prüfung einer erhitzten Milch auf das Vorhandensein reduzierender Stoffe wurde unter Ausschluß der beiden Faktoren „bakterielle Reduktion“ und „freier Sauerstoffzutritt“ durchgeführt. Die letztere Bedingung war erfüllt bei konstanter Anwendung des Wright-Burrischen anaeroben Verschlusses der Versuchsgläser; die bakterielle Reduktion wurde einfach dadurch ausgeschlossen, daß man die in bestimmter Weise erhitzte Milch und Methylenblau bei einer Temperatur aufeinander wirken ließ, bei welcher jede Bakterientätigkeit ausgeschlossen ist. Auf Grund der Ergebnisse verschiedener Versuche wurden 90° als Versuchstemperatur gewählt.

Von den vielen, im Original wiedergegebenen Versuchsreihen zur Beantwortung der Frage, in welchem Umfange beim Erhitzen der Milch Methylenblau reduzierende Substanzen auftreten, sei nur eine erwähnt. Es wurden unter den oben genannten, im Original ausführlich beschriebenen Versuchsbedingungen folgende Resultate erhalten:

Erhitzungsgrad	Entfärbungszeit		
	I. Prüfung sofort	II. Prüfung nach 24 Stdn.	III. Prüfung nach 48 Stdn.
a) 90 Min. gekocht	4—5 Min.	8 Min.	12 Min.
b) 60 „ „	19 „	31 „	32 „
c) 45 „ „	28 „	37 „	36 „
d) 30 „ „	34 „	40 „	44 „
e) 15 „ „	53 „	62 „	57 „
f) 5 „ „	69 „	78 „	77 „
g) Aufgekochte Milch . . .	79 „	94 „	87 „
h) Rohe „ . . .	86 „	56 „	geronnen

Bei der Klarlegung der Ursachen, die für den Verlauf der M-Reaktion roher bezw. gekochter Milch ausschlaggebend sind, hat man zweifellos die Fragen nach der Dauer der Erhitzung und nachherigen Aufbewahrung jeder einzelnen Milchprobe in erster Linie zu beantworten. Denn von diesen Vorbedingungen hängt es ab, inwiefern bei der Beurteilung der Entfärbungszeit der Milch die drei Faktoren: Bildung reduzierender Stoffe (je nach der Dauer der Hitzewirkung) oder Bakterienvermehrung oder Sauerstoffaufnahme (je nach der Dauer der Aufbewahrung) einzeln oder in Kombination in Betracht gezogen werden müssen.

Die vorliegende, besonders bemerkenswerte Versuchsreihe bringt den Einfluß der genannten Faktoren klar zur Anschauung. Den in engen Intervallen fortschreitenden Erhitzungsgraden entspricht bei der ersten Prüfung eine im abnehmenden Sinne stetig verlaufende Reihe von Entfärbungszeiten, wobei der geringe Unterschied im Reduktionsvermögen zwischen roher und aufgekochter Milch in die Augen fällt. Das bloße Aufkochen der Milch bedingt also noch nicht die Bildung wesentlicher Mengen reduzierender Stoffe, dagegen ist bei den länger gekochten Proben eine viel kürzere Reduktionszeit, d. h. ein bedeutend größerer Gehalt an reduzierenden Stoffen bemerkbar. Während einer Stunde oder länger gekochte Milch zeigt sofort nach dem Kochen unter den gegebenen Versuchsbedingungen ungefähr die gleiche Entfärbungszeit wie sterilisierte Milch sofort nach Entnahme aus dem Autoklaven. Das auffallende Verhalten der rohen Milch (h) bei der II. und III. Prüfung hängt zweifellos mit der während der Aufbewahrung dieser Milch kräftig einsetzenden Bakterienvermehrung zusammen. Das geht besonders deutlich aus dem Ergebnis der Prüfung nach 48 Stunden hervor. Die Ent-

färbungszeit wäre hier kürzer als eine Minute gewesen, denn die Entfärbung hatte schon während der Montierung des Anaerobenverschlusses begonnen. Das Methylenblau war also in diesem Falle vor dem in voller Mächtigkeit vorhandenen Faktor der bakteriellen Reduktion nicht geschützt geblieben, sondern seiner Wirkung in kürzester Zeit anheimgefallen. Die umgekehrte Erscheinung, d. h. die mit der Aufbewahrung zunehmende Entfärbungszeit, ist wohl kaum durch Bakterienwirkung zu erklären, obwohl eine verschieden lang gekochte Milch bei gewöhnlicher Aufbewahrung früher oder später eine üppige Bakterienflora aufweisen kann. Es ist eher anzunehmen, daß die längere Dauer der Entfärbung der erhitzten Milchproben nach 24- bezw. 48stündiger Aufbewahrung auf eine Sauerstoffaufnahme der Milch zurückzuführen ist. Tritt dann, wie bei der III. Prüfung, nach ursprünglicher Zunahme wieder eine Abnahme der Reduktionszeit ein, so sind direkt oder indirekt Bakterien im Spiel (vergl. e, f, g).

Die Erscheinung der Zunahme der Reduktionszeit bei sterilisierter Milch, die in den bakteriologischen Laboratorien in sehr verschiedenem Alter zur Verwendung gelangt, ist durch besondere Versuche veranschaulicht worden. Je nach dem Alter der sterilen Milchprobe erhält man bei der Prüfung verschiedene Resultate, in dem Sinne, als vor kurzem sterilisierte Milch kurze Entfärbungszeiten, hingegen längere Zeit gestandene Proben derselben sterilen Milch lange Entfärbungszeiten aufweisen. Bei steriler Milch kann dieses Verhalten nur mit der Sauerstoffaufnahme der Milch zusammenhängen und dieser Vorgang ist für eine bestimmte Milch abhängig vom Verhältnis der mit der Luft in Berührung befindlichen Oberfläche der Milch zu ihrem Volumen. Es ist daher ein Unterschied, ob man eine im Reagenzglas befindliche Milchprobe in gewöhnlicher Weise senkrecht, oder aber in schräger Lage aufbewahrt. Die Aufbewahrung der Milch unter großer Oberflächenentwicklung hat während kurzer Zeit dieselben Wirkungen zur Folge, die an einer in gewöhnlicher Weise aufbewahrten Milch erst nach längerer Zeit zu konstatieren sind. Folgende Zusammenstellung zeigt, daß die verschiedenen Oberflächen bei gleichem Volumen schon eine Stunde nach erfolgter Sterilisierung eine Verschiedenheit im Ausfall des Reduktionsversuches bedingen.

Aufbewahrungsalter	Entfärbungszeit	
Zeit nach dem Sterilisieren	10 ccm aufrecht aufbewahrte sterile Milch	10 ccm liegend aufbewahrte sterile Milch
Sofort	4 Min.	4 Min.
1 Stunde	10 „	13 „
5 Stunden	10 „	16 „
1 Tag	10 „	20 „
2 Tage	14½ „	23 „
3 Tage	17 „	26 „

Mit dem zunehmenden Alter der Proben nähern sich die Werte der beiden Reihen, indem die Entfärbungszeit bei den gegebenen Versuchsbedingungen ein gewisses Maximum nicht überschreitet.

3. In nicht erhitzter, bakterienreicher bezw. zellenreicher Milch kann die Ausführung der FM-Reaktion bei 40—50° keinen zuverlässigen Aufschluß über die Menge des vorhandenen Enzyms geben, indem die reduzierende Tätigkeit der Bakterien und eventuell anderer lebenden Zellen eingreift und sich mit der Wirkung des Enzyms summiert oder diese verdeckt. Die Vorgänge bei der FM-Reaktion wurden von F. Schardinger nicht näher diskutiert. Immerhin geht aus einer Stelle seiner Mitteilung hervor, daß er geneigt war, die M- und FM-Reaktion als auf gleichen Grundlagen beruhend zu betrachten. In ausgesprochener Weise vertrat E. Seligmann, auch in Sommerfeldts Handbuch der Milchkunde, den Standpunkt einer einheitlichen Auffassung der der M- und FM-Reaktion zugrunde liegenden Vorgänge, indem er dieselben als im wesentlichen bakteriellen Charakters erklärt. Auch W. D. Kooper glaubte, neue Beweise zugunsten des bazillären Ursprungs der FM-Reduktase im Sinne der Seligmannschen Anschauungen erbracht zu haben; doch lassen sich bei vorurteilsfreier Deutung des Kooperschen Versuchsmaterials viel mehr Beweise für die Enzymnatur der FM-Reduktase als gegen dieselbe finden. Zuerst hat Henry Smidt festgestellt, „daß frische, rohe Kuhmilch, welche reine Methylenblaulösung nicht oder erst nach langer Zeit, die formalinhaltige aber bereits nach wenigen Minuten entfärbt, die Annahme eines auf das Formalin katalytisch wirkenden Fermentes verlangt.“ Dieser Auffassung schloß sich Orla-Jensen an. Entscheidende Tatsachen sind in den von R. Trommsdorff und W. Rullmann gemachten Beobachtungen zu erblicken. Diese Autoren zeigten, daß keimfrei dem Euter entnommene Milch die formalinhaltige Methylenblaulösung prompt entfärbt, womit der Beweis erbracht war, daß die FM-Reaktion, wie sie mit frischer, also in der Regel keimarmer Milch ausgeführt werden kann, mit Bakterien sicher nichts zu tun hat und daher mit um so größerer Wahrscheinlichkeit als Enzymreaktion gedeutet werden muß. Eine weitere Stütze dieser Auffassung bildet der bedeutungsvolle Befund von C. Bredig und F. Sommer, wonach die FM-Lösung durch kolloidale Metalle, im besonderen Iridium und Platin, ähnlich wie durch frische Milch entfärbt wird. Diese Belege sprechen direkt für eine katalytische Wirkung des mit dem Formaldehyd an der fraglichen Reaktion beteiligten Milchbestandteils. Diese Eigenschaft mit der Hitzeempfindlichkeit und der schon früher von anderen Autoren und neuerdings wieder von Bredig und Sommer nachgewiesenen Empfindlichkeit gegen Enzymgifte lassen nicht mehr daran zweifeln, daß wir es bei der FM-Reaktion der frischen Milch mit einer typischen Enzymreaktion zu tun haben.

Man braucht sich selbstverständlich dieses Enzym nicht als besonderen, neben den bisher bekannt gewordenen Milchbestandteilen befindlichen Stoff

vorzustellen. Die in Frage stehende katalytische Wirkung könnte sehr wohl an eine besondere Struktur der Molekülkomplexe irgendeines der bekannten Milchbestandteile (z. B. nach Orla-Jensen die Hülle der Fettkügelchen) gebunden sein, eine Struktur, die wahrscheinlich schon in der Natur des Milchsekretionsvorganges begründet ist und durch höhere Wärmegrade (70—80°) eine mehr oder weniger tiefgehende Störung erleidet. Diese braucht aber nicht eine unter allen Umständen irreparable zu sein und es läßt sich denken, daß durch bestimmte chemische Agentien der ursprüngliche Zustand wieder hergestellt werden könnte. In diesem Sinne wäre die Beobachtung von Paul H. Römer und Th. Sames, daß einer gekochten Milch die verloren gegangene Fähigkeit zur Auslösung der FM-Reaktion durch Zufügung einer frisch bereiteten verdünnten Ferrosulfatlösung teilweise wiedergegeben werden kann, nicht als berechtigtes Bedenken gegen die Natur der FM-Reaktion als einer Enzymreaktion anzuerkennen, um so weniger, als Ferrosalze in einem so kompliziert zusammengesetzten Gemisch, wie es die Milch darstellt, leicht selbst zu Reduktionen Anlaß geben könnten und Eisensalze überhaupt, bezw. Eisenverbindungen ganz allgemein im Gebiet der katalytischen Reaktionen eine hervorragende, wenn auch noch wenig geklärte Rolle zu spielen scheinen.

Mag man die FM-Reaktion nun als Wirkung eines besonderen chemischen Individuums oder eines bestimmten Zustandes eines vielleicht längst bekannten Milchbestandteils auffassen, so ist es jedenfalls berechtigt, von einer Enzymreaktion zu sprechen. Man hat das bei der FM-Reaktion Wirksame mit verschiedenen Namen belegt: Schardingerenzym, Aldehydkatalase, Aldehydreduktase, indirekte Reduktase. Unter Berücksichtigung des Umstandes, daß das Spezifische der Reaktion offenbar in einer enormen Beschleunigung der Reduktionskraft des Formaldehyds zu erblicken ist, wobei aber der Reduktion des zugesetzten Farbstoffes einerseits, eine Oxydation des Formaldehyds anderseits entspricht, schlägt R. Burri als unzweideutigste und am wenigsten präjudizierende Bezeichnung „Formaldehydase“ vor.

Die im allgemeinen entschieden zu wenig gewürdigte Frage des Verhaltens der Bakterien gegenüber dem FM-Reagens ist in vorliegender Arbeit ebenfalls untersucht worden. Auf Grund der Resultate einer die in Betracht kommenden Verhältnisse zusammenfassenden Versuchsanordnung, deren nähere Darstellung jedoch zu weit führen würde, ist die Forderung aufzustellen, daß die Prüfung der Milch auf ihren Gehalt an Formaldehydase, wenn sie einwandfrei sein soll, bei 70° und nicht bei 45—50° ausgeführt werden muß. Bedenken gegen die Zuverlässigkeit einer jeden bei 45—50° ausgeführten FM-Bestimmung sind gerechtfertigt, falls nicht gleichzeitig eine Kontrollbestimmung mit M-Lösung den Beweis liefert, daß eine wesentliche Beteiligung von reduzierenden Agentien (Bakterien und zellige Elemente wie Leukocyten), die mit dem Enzym Formaldehydase nichts zu tun haben, bei dem beobachteten Entfärbungsvorgang nicht in Frage kam.

Es wird in der vorliegenden Arbeit nicht behauptet, daß nun jede im Gebiet der reduzierenden Wirkung der Milch einwandfrei beobachtete Erscheinung befriedigend erklärt werden kann; jedoch ist alle Aussicht vorhanden, daß sich mit Hilfe der gewonnenen Resultate eine große Reihe von scheinbaren Widersprüchen, die selbst in neueren und neuesten Arbeiten auftreten, in einfacher Weise wird auflösen lassen und daß zukünftige Fehler in gleicher Richtung vermieden werden könnten. Autorreferat.

Kolkwitz, R. Das Plankton des Rheinstromes, von seinen Quellen bis zur Mündung. Ber. d. Deutschen Bot. Gesellsch., **30**, 1912, H. 2, S. 205.

In der vorliegenden Arbeit zeigt Verf., wie es mit Hilfe der von ihm ausgearbeiteten, einfachen quantitativen Planktonuntersuchungsmethoden möglich ist, sich innerhalb kurzer Zeit ein Bild von der biologischen Eigenart eines großen Wasserlaufes zu verschaffen. Die ca. 1230 km lange Strecke wurde in 10 Tagen untersucht. Während das Plankton des Hoch- und Oberrheins Gebirgsfluß- und Gebirgsseecharakter aufwies, zeigte das des Mittel- und Unterrheins mehr saproben Charakter; dieser zweite Abschnitt war stark durch das Mainwasser beeinflußt. Interessant ist der Verlauf der Kurve, die die Menge der an den verschiedenen Entnahmestellen aus 50 Liter absiebbaren Schwebestoffe veranschaulicht. Hinter jedem größeren Besiedelungszentrum steigt die Kurve deutlich an, um dann wieder allmählich abzusinken infolge der Freßtätigkeit der Rädertiere, Crustaceen, Insektenlarven usw. Eine Summierung der absiebbaren Substanzen findet nicht statt, ihre Menge ist kurz vor der Einmündung des Rheins in die Nordsee nicht größer als unterhalb der Einmündung des Mains. A. Müller.

Hoover, Ch. P. Testing the Bacterial Efficiency of Hypochlorite Treatment. Engineering Record, **65**, 1912, S. 16, 439.

Verf. beschreibt ein Verfahren wie es in den Kolumbus-Wasserwerken zur bakteriologischen Kontrolle des mit Chlorkalk behandelten Wassers Anwendung findet. Die bisher übliche Methode, die sich mit der Keimzählung und der Feststellung begnügte, ob in 1 ccm des behandelten Wassers noch Keime vorhanden sind, die bei 37° in Milchzucker-Galle Gasbildung hervorzurufen vermögen, ist Verf. zu oberflächlich.

Er gießt zunächst sofort nach der Entnahme des behandelten Wassers, dann nach 24- und 48stündigem Stehen mit 1 ccm desselben Gelatine- und Agarplatten, die bei 20° bezw. 37° C aufgehoben und nach 48 und 72 Stunden gezählt werden. Um über das Vorhandensein von Milchzuckervergärern Aufschluß zu erhalten, wird 1 ccm Wasser in ein Gärungsröhrchen mit Milchzucker-Galle übertragen und 48 Stunden bei 37° C gehalten, ein weiterer Kubikzentimeter wird in ein Gärungsröhrchen mit Dextrosebouillon gegeben und 24 Stunden bei 37° angereichert, schließlich werden noch 50 ccm Wasser mit 10 ccm einer konzentrierten Bouillon vermischt und ebenfalls 24 Stunden bei 37° C gehalten.

Ist nach 24 Stunden in dem Laktose-Gallenröhrchen kein Gas gebildet, so wird je 1 ccm aus der Mischung mit Dextrosebouillon und der mit Bouillon versetzten 50 ccm-Probe in Gärungsröhrchen mit Laktose-Galle übertragen und 48 Stunden bei 37° C gehalten. Verf. hat nämlich beobachten können, daß die Milchzucker-Galle vergärenden Organismen zuweilen durch die Chlorkalkbehandlung derart geschwächt sind, daß sie in der Milchzucker-Galle nicht direkt zur Entwicklung kommen, sondern erst, nachdem sie in gewöhnlicher Bouillon vorkultiviert worden sind. Auf den nach 24- und 48stündiger Inkubationszeit gegossenen Platten werden wesentlich höhere Keimzahlen erhalten, als in den sofort gegossenen Platten, besonders dann, wenn mehr als 0,75 Teile wirksamen Chlors auf 1 Million Teile Wasser angewendet wurden. Diese Erscheinung des Nachwachsens kann durch das Vorhandensein von Sporenbildnern, aber auch durch vegetative Formen bedingt werden; in jedem Falle ist es nach dem Verf. von Wichtigkeit, festzustellen, ob diese Erscheinung zu beobachten ist, bejahendenfalls muß dann weiter ermittelt werden, ob unter den nachgewachsenen Kolonien pathogene Keime vorhanden sind. A. Müller.

van Laer, Norbert. Investigations on Bacillus subtilis in Relation to a new Microorganism in Brewing (Bacillus hordei). Journal of the Institute of Brewing, Vol. XIX, 1913, S. 4—20.

Ehe Henry van Laer im Jahre 1892 im Biere den von ihm genannten Saccharobacillus pastorianus nachgewiesen hatte, wurde dieser Organismus fehlerhaft mit dem Namen Bacillus subtilis bezeichnet. Später wurde von Adrian Brown mitgeteilt, daß die letztgenannte Bakterie ohne Bedeutung für die Bierfabrikation ist, weil sie sich in Würze oder Bier von normaler Azidität nicht entwickelt. Außerdem ist der Bacillus subtilis aërob, so daß man auch aus diesem Grunde es für unmöglich hielt, daß er beim Ausschluß freien Sauerstoffes im Bier gedeihen könnte.

Verf. hat aber gefunden, daß der B. subtilis, welcher nach Vincent daran gewöhnt werden kann, auch anaërob aufzutreten, im Biere ohne Sauerstoff leben kann und hier Sporen zu bilden imstande ist. Während seines Studiums dieser Bakterie fand Verf. auf Gerste einen Mikroorganismus, dessen Sporen sehr resistent waren, indem sie imstande sind, ein 5stündiges Kochen zu vertragen. Auf alter Gerste (aus dem Jahre 1885) war der Bacillus noch lebend. Dieser Organismus — vom Verf. B. hordei genannt — ist dem B. subtilis sehr ähnlich und wurde früher mit diesem verwechselt. Van Laer bringt Angaben über die Morphologie und Biologie dieses beweglichen, sporenbildenden Stäbchens, welches sich leicht nach Gram färbt. Die Optimaltemperatur für das Wachstum ist 27° C. Es gedeiht ebensogut als Aërobiont wie als Anaërobiont. Es wächst in ungehopfter, nicht aber in gehopfter Würze, dagegen im Bier; gibt Indolreaktion (was bei B. subtilis nicht der Fall ist). Sporen des B. subtilis werden in nicht gehopfter Würze

nach zweistündigem Kochen getötet, was mit Sporen des B. hordei nicht der Fall ist. Letzterer muß als ein Bierschädling betrachtet werden, weil er auf den Geschmack und Glanz des Bieres einen Einfluß hat; dasselbe ist, obwohl in geringerem Grade, mit B. subtilis der Fall. Nach dreimonatlicher Lagerung und Pasteurisation des Bieres bei 77° C während einer halben Stunde waren sowohl B. subtilis als B. hordei noch lebend.

Weil die Sporen von B. hordei häufig auf Gerste und Malz auftreten, wird eine Infektion leicht von der Mälzerei in die Brauerei übertragen werden können. Just. Chr. Holm.

Day, F. E. and Baker, Julian L. A Bacterium causing Ropiness in Beer. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 36, 1913, S. 433—438.

Die Verff. geben zuerst eine kurze Literaturübersicht über die Arbeiten, welche von schleimbildenden Organismen handeln, die teils im Brot, Milch, Zucker, Wein und Most, teils in der Lohbrühe, in pharmazeutischen Infusen und im Biere vorkommen können.

Es wurden eine Anzahl von Proben fadenziehender Biere aus drei verschiedenen Brauereien untersucht und die darin auftretenden Organismen isoliert. Diese, welche auf verschiedenen Nährböden kultiviert wurden, zerfielen in zwei Gruppen: A., Bakterien, welche Alkohol zu Essigsäure oxydieren und in Medien, welche Kohlenhydrate enthalten, kein Gas entwickeln, und B., die Alkohol nicht oxydieren, wohl aber in Kohlenhydraten Gas entwickeln. Die Bakterien, welche zur Gruppe A gehören, bestehen aus Kurzstäbchen, meistens zu zweien verbunden; einzelne Bakterien sowie Ketten kommen aber auch vor. Keine Sporenbildung. Sie färben sich schwach nach Gram. Falls sie in Flüssigkeiten, die Alkohol enthalten, gezüchtet werden, bilden sie eine dünne Haut, und der Alkohol wird zu Essigsäure, die Glukose zu Glukonsäure oxydiert. Die Optimaltp. für das Wachstum liegt zwischen 20 bis 25° C. (Auf einer beigegebenen Tafel sind die kulturellen Charaktere der betreffenden Organismen angegeben.) Sie sind alle als eine Art mit Varietäten zu betrachten. Die Art ist dem B. albuminosum (Zeidler und Lindner) sehr ähnlich, weicht aber durch ihr Wachstum auf festen Substraten von dieser ab. Verff. nennen sie B. aceti viscosum; sie trat in allen englischen Bierproben, welche fadenziehend waren, auf. Wenn die isolierten Organismen kräftig sind, rufen sie alle — sehr leicht in Stout, schwieriger aber in Ale — eine Schleimbildung hervor. Die Organismen überleben die Gärung. Falls die Luft während der Entwickelung dieser Bakterie Zutritt hat, wird viel Säure — in einigen Fällen 3% Essigsäure — gebildet, in welchem Falle der Schleim verschwindet; man wird kein fadenziehendes Bier mit mehr als 1,5% finden können. Eine Variation in der Hopfengabe oder in der Menge von Kohlenhydraten sowie von gelöstem Protein innerhalb der üblichen Grenzen hat keinen Einfluß auf das Wachstum des B. aceti viscosum. Die Bakterien, welche zur Gruppe B gehören, bestehen aus Kurzstäbchen, die sich nach

Gram gut färben und alle verwendeten Substrate fadenziehend machen. Der Schleim wird aus Proteinstoffen gebildet und ist von der Anwesenheit der Kohlenhydrate, sowie der mehrwertigen Alkohole nicht abhängig; die letzteren werden unter Bildung von Kohlensäure und Wasserstoff zersetzt. Die der Abhandlung beigegebene Tafel zeigt, daß man es mit zwei verschiedenen Bakterienarten zu tun hat. Falls sie direkt ins Bier eingeführt werden, findet keine Infektion statt; in Würze eingeführt, können sie die Gärung überleben. Nur dann, wenn sie in reichlicher Menge eingeführt wurden, trat bei einer Form (Nr. VIII) Schleimbildung im Bier auf. Diese Organismen sind von B. aceti viscosum verschieden und gehören vielleicht unter die von Zikes beschriebenen Wasserbakterien. Just. Chr. Holm.

Sopp, Olav Johan-Olsen. Monographie der Pilzgruppe Penicillium mit besonderer Berücksichtigung der in Norwegen gefundenen Arten. (23 Tafeln und 1 Fig. im Text.) I. Videnskabs Selskabets Skrifter I Mathem.-Nat. Klasse, Kristiania 1912, S. 1—205.

Penicillien treten in Norwegen als spezielle Erdbodenpilze auf. Sie sind besonders in nicht angebautem Boden und vor allem in Waldböden zu finden. Sie haben Bedeutung für die Bildung des Humus, speziell des Waldhumus. Sie wachsen besonders gut bei niedrigen Temperaturen, einige auch bei 40—45° C. Es gibt auch welche, die sogar nur bei Körpertemperatur wachsen. Außerhalb des Waldes sind noch zwei Fundorte zu erwähnen, nämlich feuchte Kellerräume und Küchenabfallhaufen (Kehrichthaufen).

Verf. gibt zunächst die Morphologie der verschiedenen Gattungen. Es treten sowohl typische Oidien, wie Chlamydosporen (bei Acaulium) auf; Ascusfrüchte (Sclerotien oder Perithecien) bilden sich schwieriger in Reinkulturen, als wenn der Pilz mit anderen Schimmelpilzen zusammen wächst. Bei der Physiologie wird die Bedeutung der Pilzgruppe für die Gärungsindustrie erwähnt. Die Enzymwirkungen (Pepsin, Trypsin, Cytase, Lipase, Diastase, Katalase, Invertase), sowie die verschiedenen Gärungen: Alkoholgärung, Zitronensäure-, Oxalsäure- und Buttersäuregärung werden besprochen. Untersuchungsmethoden und Arbeitsverfahren werden ausführlich behandelt; schließlich gibt Verf. die Systematik der Pilzgruppe. Folgende Gattungen wurden beschrieben: Daktylomyces, Acaulium, Stysanus, Gliocladium und Penicillium, die letztere mit den Untergattungen: Citromyces, Corollium und Aspergillopsis. Just. Chr. Holm.